VERGLEICH DER DNA-ABHÄNGIGEN RNA-POLYMERASE AUS MICROCOCCUS LUTEUS UND ESCHERICHIA COLI MIT PEPTID- UND IMMUNCHEMISCHEN METHODEN

Christine Leib

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547005_0032

VERGLEICH DER DNA-ABHÄNGIGEN RNA-POLYMERASE AUS MICROCOCCUS LUTEUS UND ESCHERICHIA COLI MIT PEPTID- UND IMMUNCHEMISCHEN METHODEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Christine Leib

München 1979

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 26. März 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Die vorliegende Arbeit wurde von März 1975 bis Januar 1979 auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Professor Dr. G. Hartmann am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München ausgeführt.

Herrn Professor Dr. S. Thierfelder, Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, danke ich für die Herstellung der Antiseren gegen RNA-Polymerase.

Für wertvolle Anregungen möchte ich mich bei Frau Professor Dr. U. Gröschel-Stewart, Institut für Zoologie der Technischen Hochschule Darmstadt, bedanken.

Mein Dank gilt insbesondere auch Herrn Dr. M. Rupprecht und Herrn Professor Dr. K.-H. Schleifer, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München, für die Anleitung zur Durchführung der Komplementbindungsversuche.

Herrn Dr. W. Schartau, Zoologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für die Endgruppenbestimmung.

Herrn Dr. K.O. Stetter, Botanisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, und Herrn Dr. B. Rexer, MPI für Biochemie, Abt. Prof. Zillig, Martinsried, danke ich für RNA-Polymerasepräparationen aus verschiedenen Bakterien.

Außerdem möchte ich mich bei allen Institutsangehörigen bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methoden	3
Material	3
Methoden	7
1. Isolierung der RNA-Polymerase	7
2. Auftrennung der RNA-Polymerase in ihre Untereinheiten	9
3. Proteinbestimmung	10
4. Aktivitätstest der RNA-Polymerase	11
5. Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	12
6. Reduktion und Carboxymethylierung der Untereinheiten	14
7. Tryptischer Fingerprint	14
8. Bromcyanspaltung	17
9. Gewinnung von Antiserum gegen RNA-Polymerase	17
10. Immundiffusion	20
11. Immunpräzipitation nach Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	21
12. Mikrokomplementfixierung	22
Ergebnisse	35
I. Peptidchemische Untersuchungen	35
1. Spaltung mit Trypsin	35
Fingerprint in System I	36
Fingerprint in System II	37
2. Spaltung mit Bromcyan	47
Untereinheit $^{e}\alpha$	47
Untereinheit $^{m}\alpha$	51
Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheit α	53
Vergleich der Bromcyanfragmente von $^{e}\beta$ und $^{e}\beta'$ mit $^{m}\beta$ und $^{m}\beta'$	55

Seite

II. Immunologische Verwandtschaft der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase 57

1. Vergleich durch Immundiffusion 59

Core- und Holoenzyme 59

Dissoziierte RNA-Polymerase 61

2. Vergleich durch Mikrokomplementfixierung 65

Core- und Holoenzyme 66

Untersuchung mit Anti-^{m}holo-Serum 66

Untersuchung mit Anti-^{e}holo-Serum 71

Zusammenhang zwischen Immunologischer Distanz und Primärstruktur 73

Isolierte Untereinheiten 76

Spezifität der Antiseren 76

Immunologische Distanz 78

3. Vergleich der Enzymaktivität in Gegenwart der Antiseren 83

III. Immunologische Verwandtschaft mit anderen RNA-Polymerasen 90

1. Rifampicinsensitive und -resistente RNA-Polymerasen 90

2. RNA-Polymerasen aus verschiedenen Organismen 93

Vergleich durch Immundiffusion 93

Vergleich durch Mikrokomplementfixierung 96

Untersuchung mit Anti-^{m}holo-Serum 96

Untersuchung mit Anti-^{e}holo-Serum 101

Diskussion 104

Literaturverzeichnis 114

Zusammenfassung 125

Abkürzungsverzeichnis 127

Lebenslauf 129

Einleitung

In Bakterien ist das zentrale Enzym bei der Transkription der genetischen Information die DNA-abhängige RNA-Polymerase (EC 2.7.7.6). Das Enzym wurde aus zahlreichen Bakterien isoliert (Übersicht: Burgess, 1976). Alle bisher untersuchten prokaryotischen RNA-Polymerasen gleichen sich mit einer Ausnahme (Zillig et al., 1978) in Größe und Aufbau. Sie sind aus fünf einzelnen Polypeptidketten zusammengesetzt: zwei großen, aber nicht identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht um 160 000, als β und β′ bezeichnet; zwei kleinen, identischen Untereinheiten, genannt α, mit einem Molekulargewicht um 40 000; und dem Initiationsfaktor σ mit einem Molekulargewicht zwischen 44 000 und 100 000. Die Untereinheiten bilden zwei enzymatisch aktive Komplexe mit der stöchiometrischen Zusammensetzung $\beta'\beta\alpha_2$ (Coreenzym) und $\beta'\beta\alpha_2\sigma$ (Holoenzym). Keine der isolierten Untereinheiten zeigt jedoch irgend eine enzymatische Aktivität.

Die RNA-Polymerase aus dem gramnegativen Organismus Escherichia coli wurde besonders eingehend untersucht (Burgess, 1976). Daneben wurde an unserem Institut auch eine RNA-Polymerase aus dem grampositiven Organismus Micrococcus luteus angereichert (Lill et al., 1977). Obwohl sich beide Bakterien in taxonomischen Merkmalen, zum Beispiel im GC-Gehalt ihrer DNA (Belozersky und Spirin, 1960), deutlich unterscheiden, können sich die Untereinheiten ihrer RNA-Polymerasen gegenseitig in ihrer Funktion im enzymatisch aktiven Komplex ersetzen (Lill, Behrendt und Hartmann, 1975). Da keine der Untereinheiten für sich katalytisch aktiv ist, muß eine enge Kooperation zwischen den einzelnen Untereinheiten der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase stattfinden, um zur Bildung aktiver Enzymhybride zu führen. Eine solche Kooperation

ist jedoch nur dann möglich, wenn die ausgetauschten Untereinheiten nicht nur die gleiche Funktion besitzen, sondern auch über eine ausreichende stukturelle Ähnlichkeit verfügen. Man sollte daher erwarten, daß sich - trotz aller phylogenetischer Unterschiede der Organismen - bei beiden RNA-Polymerasen gemeinsame Strukturen erhalten haben, die eine gegenseitige Erkennung der E. coli und M. luteus Untereinheiten und damit ihre Assoziation zu einem aktiven Hybridkomplex ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit soll die Frage nach dieser Verwandtschaft mit Hilfe protein- und immunchemischer Methoden geklärt werden.

Material und Methoden

Material

Bakterien:

E. coli MRE 600 wurde nach der Vorschrift von Richardson et al. (1964) gezüchtet.
Serratia marcescens (von Herrn Dr. H. Wolf, Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, Universität München, zur Verfügung gestellt) wurde unter Belüftung bei 30°C in Luria-Broth (Modrich und Zabel, 1976) gezüchtet.
Die Bakterien wurden in der späten logarithmischen Phase geerntet und bei -20°C aufbewahrt.

M. luteus Wildtyp wurde als gefrorene Paste von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen (Kat. Nr. 1268 T 5169).

Micrococcus lylae ATCC 27566, Micrococcus varians CCM 884 und Staphylococcus aureus ATCC 12600 wurden von Herrn Dr. M. Rupprecht, Botanisches Institut der Universität München, zur Verfügung gestellt.

RNA-Polymerase-Präparationen:

Rifampicinresistentes E. coli und M. luteus Coreenzym sowie M. luteus σ-Faktor erhielt ich von Frau Dr. U. Lill. E. coli σ-Faktor wurde von Frl. S. Klüpfel nach einer Vorschrift von Burgess et al. (1969) aus E. coli Holoenzym isoliert.

RNA-Polymerase aus Lactobacillus casei und Lactobacillus curvatus wurde von Herrn Dr. K. O. Stetter, Botanisches Institut der Universität München, zur Verfügung gestellt.

Bacillus stearothermophilus RNA-Polymerase erhielt ich

von Herrn Dr. B. Rexer, Abt. Prof. Zillig, MPI für Biochemie, Martinsried.

RNA-Polymerase II aus Weizenkeimen wurde mir von Frl. T. Reiter zur Verfügung gestellt.

Enzyme und Eichproteine:

Kristallisierte Pankreas Desoxyribonuklease I (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, USA)

Trypsin aus Rinderpankreas, TPCK-behandelt und zweifach chromatographiert; Myoglobin vom Pferd (Serva, Heidelberg)

Lysozym aus Hühnereiweiß, Ovalbumin, Trypsininhibitor aus Sojabohne (Boehringer Mannheim GmbH)

Rinderserumalbumin, elektrophoretisch rein (Behringwerke, Marburg)

Immunologische Reagenzien:

Ziegenantiserum gegen Kaninchen 7S-γ-Globulin, fluoreszenzmarkiert (Hyland, Travenol Laboratories, Costa Mesa, Kalifornien, USA; Travenol GmbH, München)

Amboceptor (Anti-Hammelerythrozyten-Serum von Kaninchen), Titer 1 : 4000; Hammelblut, konserviert; Meerschweinchenkomplement, konserviert; Freunds komplettes und inkomplettes Adjuvans (Behringwerke Marburg)

Chemikalien:

Ribonucleosid-5′-triphosphate (Boehringer Mannheim GmbH)

[^{14}C]UTP (NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain bei Frankfurt). Die markierte Verbindung wurde mit unmarkiertem UTP auf eine Radioaktivität von 1 mCi/mmol verdünnt.

Lachssperma DNA (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, USA)

Asparaginsäure, Glycin, Histidin, Lysin, Dinitrophenyl-Asparaginsäure, Dinitrophenyl-Lysin (Serva, Heidelberg)

Bacto Tryptone, Bacto Yeast Extrakt (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)

DEAE Cellulose DE 52, Phosphocellulose P 11 (Whatman, Springfield Mill, England, bezogen über Hormuth & Vetter, Wiesloch, Baden)

Dithioerythrit (DTE); Gelatine (Sigma Chemie, München)

2-Mercaptoäthanol, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris); Bromcyan (Fluka, Eschborn/Taunus)

Fluorescamin ("Fluram") (Hoffmann-LaRoche, Basel)

Triäthylamin, sequanal grade (Pierce, Rockford, Illinois, USA, bezogen über Günter Karl OHG, Geisenheim-Johannisberg)

5,5-Diäthylbarbitursäure, Natrium-5,5-diäthylbarbiturat, Merthiolat, Agarose, Acrylamid, N,N′-Methylenbisacrylamid, N,N,N′,N′-Tetramethyläthylendiamin (TEMED), Coomassie Brillant Blue G-250, Amidoschwarz 10B (Serva, Heidelberg)

3-Dimetylaminopropionitril (Merck-Schuchardt, München)

Bromphenolblau, Ammoniumperoxodisulfat, Jodacetamid, Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA), Harnstoff für biochemische Zwecke (Merck, Darmstadt)

Polyäthylenglycol (Typ 20 000) (Roth, Karlsruhe)

Trichloressigsäure (Geschenk der Farbwerke Hoechst)

Nachgereinigter Stickstoff (Linde, München)

Sonstiges:

Kieselgel-Dünnschichtplatten Sil G-25 (Machery, Nagel & Co, Düren)

CAF-Verbindungsbrücken, 190 x 45 mm (Desaga, Heidelberg)

Dialysierschlauch Visking (Serva, Heidelberg)

Membranfilter (für Ultrafiltration) Diaflo UM 20 (Amicon GmbH, Witten/Ruhr)

Whatman GF/C Glasfaserfilter (Hormuth & Vetter, Wiesloch, Baden)

Alle übrigen Substanzen waren vom besten käuflichen Reinheitsgrad.

Alle Lösungen wurden unter Verwendung von bidestilliertem Wasser hergestellt.

Der pH-Wert von Trispuffer wurde, wenn nicht anders angegeben, bei 25°C eingestellt.

Methoden

1. Isolierung der RNA-Polymerase

RNA-Polymerase aus E. coli:

E. coli Coreenzym wurde nach der Vorschrift von Burgess (1969a) mit den bei Lill (1973) beschriebenen Veränderungen angereichert.
E. coli Holoenzym wurde in Anlehnung an die von Burgess und Jendrisak (1975) und Schaller et al. (1972) entwickelten Anreicherungsverfahren isoliert. Die von diesen Verfahren abweichenden Schritte sind bei Kessler (1976) beschrieben.

RNA-Polymerase aus M. luteus:

Die Anreicherung der M. luteus RNA-Polymerase erfolgte nach Lill et al. (1977).

Die Reinheit der Enzympräparationen wurde durch Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese überprüft (Fig. 1).

Partielle Anreicherung der RNA-Polymerase in Bakterienrohextrakten:

Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurden 5 g Serratia marcescens (Feuchtgewicht) in 10 ml 0,05 M Tris-HCl Puffer pH 7,5 (gemessen bei 4°C), der 0,01 M $MgCl_2$, 0,2 M KCl, 0,1 mM EDTA, 5 % Glycerin und 0,1 mM Dithioerythrit enthielt, 10 min mit einem Branson Sonifier, Modell S 75 bei 3,6 - 4,0 mA beschallt. Die Temperatur während der Beschallung betrug 0 - 6°C. Die aufgeschlossenen Zellen wurden 45 min zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, SS 34, 20 000 Upm); der Überstand wurde weiterverarbeitet.

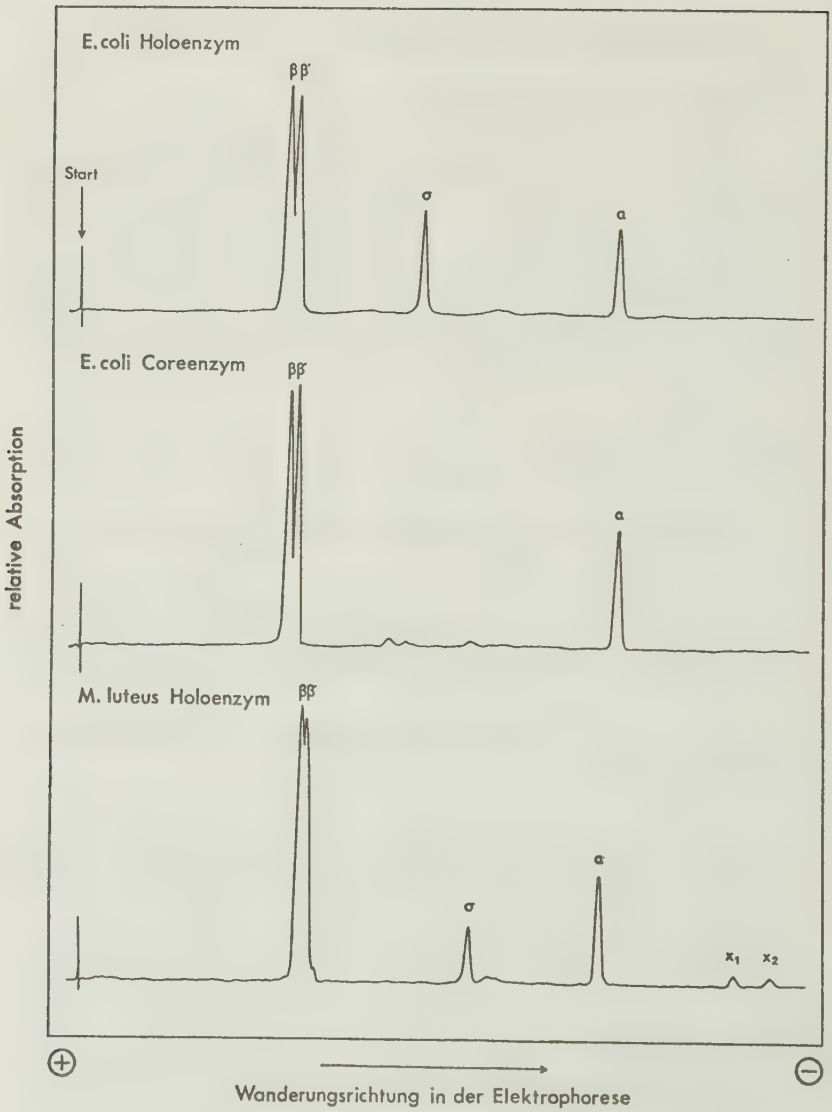

E.coli Holoenzym
ββ'
Start
σ
α
E.coli Coreenzym
ββ'
α
M. luteus Holoenzym
ββ'
σ
α
x1
x2
relative Absorption
⊕
⊖
Wanderungsrichtung in der Elektrophorese

Fig. 1 Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der zur Imunisierung verwendeten Enzympräparationen

Jeweils 1 µg RNA-Polymerase wurde in 10 µl Probenpuffer (Laemmli,1970) 30 min bei 37°C inkubiert und auf ein Polyacrylamid-Plattengel mit einem linearen Gradienten von 5 - 15 % Acrylamid aufgetragen (vergl. Methoden, Kap. 5). Dauer der Elektrophorese: 18 h, Spannung: 60 V, Stromstärke: 10 - 12 mA.

Zellfreie Extrakte von Micrococcus lylae, Micrococcus varians und Staphylococcus aureus wurden mir von Herrn Dr. M. Rupprecht, Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität München, zur Verfügung gestellt.

Die Bakterienrohextrakte wurden, wie bei Tafler et al. (1973) beschrieben, einer Desoxyribonuclease-Behandlung unterzogen. Anschließend wurde durch Ammoniumsulfatfällung (30 - 50 % Sättigung) fraktioniert (Burgess, 1969a) Die Anwesenheit von RNA-Polymerasen in den Fraktionen wurde durch Elektrophorese in Dodecylsulfat-Plattengelen mit 10 % Acrylamid anhand der Proteinbanden von β und β' überprüft. Die RNA-Polymerase enthaltenden Fraktionen wurden gegen 0,01 M Tris-HCl Puffer pH 7,9 dialysiert und anschließend sofort im Mikrokomplementfixierungstest eingesetzt.

2. Auftrennung der RNA-Polymerase in ihre Untereinheiten

Die Isolierung der Untereinheiten erfolgte wie bei Lill, Behrendt und Hartmann (1975) beschrieben.
Abweichend von dieser Vorschrift wurde das Volumen der Phosphocellulosesäule auf 3,1 cm^2 x 8,5 cm erhöht. Außerdem wurde die M. luteus RNA-Polymerase, um den Glyceringehalt herabzusetzen und Magnesium zu entfernen und damit die Phosphocellulose weniger zu belasten, vor der Harn-

stoffbehandlung gegen 0,05 M Tris-HCl Puffer pH 7,9 (mit 0,1 mM EDTA, 1mM Dithioerythrit und 10 % Glycerin) dialysiert. Die Auftrennung der Untereinheiten der M. luteus RNA-Polymerase wurde bei pH 8,5 durchgeführt.
Die Präparationen von $^{e}\beta$ enthielten häufig noch geringe Mengen an $^{e}\beta'$, und ebenso konnten in den $^{m}\alpha$ enthaltenden Fraktionen Verunreinigungen durch $^{m}\beta$ im Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel nachgewiesen werden. Sowohl $^{e}\beta$ als auch $^{m}\alpha$ wurden daher an einer Phosphocellulosesäule (3,1 cm^2 x 5 cm) rechromatographiert.
Die für die immunchemischen Versuche verwendeten Untereinheiten wurden zur Einengung gegen 20 % Polyäthylenglycol 20 000 dialysiert (Nüsslein und Heyden, 1972).
Bei den peptidchemischen Untersuchungen erwies sich die Anwesenheit von kleinen Mengen an niedermolekularem Polyäthylenglycol in den Proteinlösungen als störend. Die Lösungen wurden für diese Versuche daher durch Ultrafiltration (Amicon Ultrafiltration Cell Modell 12, Filter: Diaflo UM 20) konzentriert, oder die Untereinheiten wurden aus polyäthylenglycolhaltigen Lösungen mit Äthanol gefällt. Dazu wurden 1 - 2 mg Protein enthaltende Lösungen mit drei Teilen auf -20°C gekühltem Äthanol versetzt und in der Tischzentrifuge unter Kühlung 30 min bei 3 000 Upm zentrifugiert. Der Niederschlag wurde noch zweimal mit je 1 ml 75-prozentigem Äthanol gewaschen und anschließend 1 h über KOH getrocknet.

3. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Lowry et al. (1951) wie bei Jaenicke (1966) beschrieben durchgeführt.
Bei den isolierten Untereinheiten der RNA-Polymerase wurde, um Material zu sparen, die Proteinbestimmung durch quantitative Auswertung der Proteinbanden nach

Elektrophorese in 6 %igen Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Rundgelen vorgenommen (Lill und Hartmann, 1975). Für die Eichkurve wurde σ-gesättigte RNA-Polymerase aus E. coli verwendet.

4. Aktivitätstest der RNA-Polymerase

Der Testansatz für die E. coli RNA-Polymerase (Volumen 0,25 ml) enthielt 0,05 M Tris-HCl Puffer pH 7,9; 8 mM $MgCl_2$; 2 mM $MnCl_2$; 0,1 mM Dithioerythrit; je 0,6 mM ATP, CTP, GTP; 0,4 mM [^{14}C]UTP; 0,16 mg Lachssperma DNA und Enzym.
Abweichend davon enthielt der Testansatz für die M. luteus RNA-Polymerase 2,5 mM $MnCl_2$ und kein $MgCl_2$.
Nach 10 min Inkubation bei 37°C wurde nach einer abgewandelten Vorschrift von Sentenac et al. (1968) mit 5 %iger Trichloressigsäure (mit 40 mM Na_2HPO_4 und 25 mM $Na_4P_2O_7$) gefällt und die Radioaktivität im säureunlöslichen Rückstand bestimmt (vergl. H. Lill, 1973).
In Gegenwart von Immunglobulin im Testansatz wurde, um die Filtrierbarkeit der Niederschläge zu verbessern, wie folgt verfahren:
Nach der Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion im Eisbad mit 0,25 ml 50 mM EDTA-Lösung gestoppt. Dann wurde sofort mit 1 ml auf -20°C gekühltem Äthanol gefällt, die Mischung im Methanol/Trockeneis-Kältebad eingefroren und 1 - 2 h auf -20°C gehalten. Der Rückstand wurde auf Whatman GF/C Glasfaserfiltern gesammelt, mit 70 ml 5%iger Trichloressigsäure (mit 40 mM Na_2HPO_4 und 25 mM $Na_4P_2O_7$) und anschließend mit 3 ml 96 %igem Äthanol nachgewaschen. Die Filter wurden getrocknet und die Radioaktivität im Rückstand bestimmt.

5. Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Rundgele:

Die Elektrophoresen wurden nach der Methode von Shapiro et al. (1967) mit den bei Seydel (1978) beschriebenen Veränderungen durchgeführt. Die Gele enthielten 6 % Acrylamid mit einem Verhältnis von Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid wie 30 : 0,8. Die Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen mindestens 1 : 1 mit Probenpuffer (Burgess, 1969b) verdünnt und wenn nicht anders angegeben 30 min bei 37°C inkubiert.
Elektrophorese (bei Raumtemperatur):
Dauer: 3 h, Spannung: 30 V, Stromstärke: 7 - 8 mA pro Gel.
Das Färben der Gele mit Coomassie Brillant Blue G 250 und die densitometrische Aufzeichnung der Proteinbanden erfolgte wie bei Seydel (1978) beschrieben.

Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Plattengele:

Es wurde nach der Vorschrift von Laemmli (1970) gearbeitet.

Zusammensetzung der Gele:
1) Gele mit konstanter Acrylamidkonzentration

Trenngel:	0,375 M Tris-HCl pH 8,8
	0,1 % Natriumdodecylsulfat
	10 % Acrylamid (Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid = 30 : 0,8)
	0,03 % $(NH_4)_2S_2O_8$
	0,05 % (v/v) TEMED
Obergel:	0,124 M Tris-HCl pH 6,8
	0,1 % Natriumdodecylsulfat
	4,5 % Acrylamid (Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid = 30 : 0,8)
	0,03 % $(NH_4)_2S_2O_8$
	0,05 % (v/v) TEMED

2) Gele mit linearem Acrylamidgradienten

Trenngel: 0,375 M Tris-HCl pH 8,8
0,1 % Natriumdodecylsulfat
5 - 15 % Acrylamid (Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid)
0,045 - 0,015 % $(NH_4)_2S_2O_8$
0,075 - 0,025 % TEMED

Sammelgel: Zusammensetzung wie unter 1) beschrieben, jedoch mit 3 % Acrylamid

Das Anfärben der Gele und die densitometrische Auswertung wurde wie bei Lojda (1972) beschrieben durchgeführt.

Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Plattengele mit Harnstoff:

Die Elektrophoresen erfolgten nach der Vorschrift von Laemmli (1970) im System von Krause und Wilmann (1977) modifizierten Gelsystem.

Zusammensetzung der Gele:

Trenngel: 0,375 M Tris-HCl pH 8,8
6 M Harnstoff
0,1 % Natriumdodecylsulfat
11,5 % Acrylamid (Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid = 30 : 1)
0,015 % $(NH_4)_2S_2O_8$
0,25 % TEMED

Sammelgel: Zusammensetzung wie auf S. 12 unter 1) angegeben

Die Gele wurden mit einer 0,25 %igen Coomassie Brilliant Blue G 250 Lösung in Methanol : Eisessig : H_2O = 5 : 1 : 5 angefärbt. Entfärben und Auswertung der Gele wurde wie bei Lojda (1972) beschrieben durchgeführt.

6. Reduktion und Carboxymethylierung der Untereinheiten

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Waxdal et al. (1968). 1 - 2 mg lyophilisierte α-Untereinheit wurden in 0,2 ml 0,5 M Tris-HCl Puffer pH 8,1 (mit 8 M Harnstoff und 0,002 M EDTA) gelöst und unter Stickstoff 1 h auf 50°C erhitzt. Mit den Untereinheiten β und β' wurde analog verfahren, jedoch wurde ein Puffer verwendet, der 6 M Guanidinhydrochlorid anstelle von Harnstoff enthielt.
Anschließend wurden die Lösungen mit 0,77 mg (5 µmol) Dithioerythrit versetzt und weitere 4 h unter Stickstoff bei 50°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 3,7 mg (20 µmol) Jodacetamid zugegeben und die Lösungen bei Raumtemperatur vor Licht geschützt 2 h stehen gelassen. Nach Beendigung der Reaktion wurden die carboxymethylierten Untereinheiten gegen 3 x 2 l H_2O dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

7. Tryptischer Fingerprint

Trypsinspaltung:

Die tryptische Hydrolyse wurde in Anlehnung an Canfield (1963) und Katz et al. (1959) vorgenommen. 1 - 2 mg der carboxymethylierten α-Untereinheit wurden in 0,2 ml 0,1 M Ammoniumcarbonat Puffer pH 8 gelöst und 7 - 8 h bei 37°C mit TPCK-behandeltem Trypsin inkubiert. Das Trypsin wurde in kleinen Portionen in Abständen von 2 h bis zu einer Gesamtmenge von 50 µg zugesetzt. Der pH wurde durch Zugabe von 1 : 10 verdünntem Ammoniak konstant gehalten (Indikator: Phenolrot). Zur Beendigung der Reaktion wurde das tryptische Hydrolysat eingefroren und anschließend lyophilisiert.

Die zweidimensionale Auftrennung der Peptide erfolgte nach einer Vorschrift von Bates et al. (1975).

Elektrophorese:

Die getrockneten tryptischen Peptide wurden in 0,05 M Ammoniak gelöst (2 mg / 100 µl). 5 µl dieser Lösung wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, herunterzentrifugiert und mit einem Schmelzpunktröhrchen aufgenommen, das an einem Ende zu einer Kapillare ausgezogen worden war. Die Lösung wurde damit auf eine 20 x 20 cm große Kieselgel-Dünnschichtplatte (Sil G 0,25 mm, Machery, Nagel & Co), etwa 2,5 cm vom Rand entfernt, in mehreren kleinen Portionen unter ständigem Trocknen mit einem Kaltluftföhn aufgebracht, so daß der Durchmesser der Auftragstelle nicht mehr als 2 mm betrug. In gleicher Höhe mit der Auftragstelle der Probe wurden auf der gegenüberliegenden Seite (senkrecht zur Elektrophoreserichtung gesehen), etwa 1 cm vom Rand entfernt, 2 µl einer Elektrophoresemarkermischung, bestehend aus Asparaginsäure, Glycin, Histidin, Lysin, Dinitrophenyl-Asparaginsäure und Dinitrophenyl-Lysin (je 1 mg/ml in 0,05 M Ammoniak), auf die Dünnschichtplatte aufgetragen.
Die Elektrophorese wurde in einer Desaga DE-Doppelkammer mit dem Netzgerät LKB 2103 durchgeführt. Die Dünnschichtplatte wurde dazu, unter Verwendung von Stickstoff als Treibmittel, gleichmäßig mit Elektrophoresepuffer besprüht, wobei jedoch die Auftragstellen der Proben ausgespart blieben. Die Befeuchtung der Auftragstellen erfolgte durch Diffusion des Puffers aus der Umgebung. Überschüssiger Elektrophoresepuffer wurde mit Filterpapier aufgesaugt. Die Verbindung zwischen der Dünnschichtplatte und den Elektroden wurde mit Celluloseacetat-Streifen (CAF-Verbindungsbrücken, Desaga) hergestellt. Um eine Verdunstung des Puffers während der Elektrophorese zu verhindern, wurde die Dünnschichtplatte mit einer Glas-

platte gleicher Größe bedeckt. Während der Elektrophorese wurde die Dünnschichtplatte auf 0 - 1°C gekühlt.

Elektrophoresepuffer:

1) pH 6,5
   Pyridin : Eisessig : H_2O = 25 : 1 : 225
   (Perham, 1967)
2) pH 1,9
   2 M Essigsäure, 0,6 M Ameisensäure
   (Fujiki et al., 1976)

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Dünnschichtplatte 30 min bei 100°C getrocknet.

Chromatographie:

Auf die Elektrophorese folgte in zweiter Dimension eine aufsteigende Chromatographie in einer Desaga-Trennkammer.

Laufmittel:

1) n-Butanol : Eisessig : Ameisensäure : H_2O =
   4 : 1 : 1 : 1
   (Rueckert und Duesberg, 1966)
2) n-Butanol : Pyridin : Eisessig : H_2O =
   15 : 10 : 3 : 12
   (Bates et al., 1975)

Die Chromatographie wurde beendet, sobald die Laufmittelfront die Elektrophoresemarker erreicht hatte.

Auswertung der Fingerprints:

Nach gründlichem Trocknen der Dünnschichtplatte wurden die Peptide nach der Vorschrift von Felix und Jimenez (1974) mit Fluorescamin gefärbt. Die angefärbten Platten wurden mit zwei UV-Lampen (Emissionsmaximum bei 254 nm, Abstand vom Objekt ca. 25 cm) beleuchtet und unter Ver-

wendung eines Gelbfilters (Leitz Serie VI) fotographiert. Aufnahmefilm: Ilford HP5, 400 ASA, 27 DIN; Blende 8, Belichtungszeit: 3 - 10 Sekunden.

8. Bromcyanspaltung

Die Bromcyanspaltung der Untereinheiten erfolgte nach Steers et al. (1965). 0,25 mg der carboxymethylierten Untereinheiten wurden in 0,5 ml 70 %iger Ameisensäure suspendiert, mit 0,75 mg Bromcyan versetzt und im Dunkeln bei Raumtemperatur 21 h stehen gelassen. Nach ca. 5 h war alles Protein gelöst. In Abständen von 7 h wurden je 50 µl entnommen, mit 1 ml kaltem H_2O verdünnt und eingefroren. Die lyophylisierten Proben wurden auf harnstoffhaltigen Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Plattengelen analysiert.

9. Gewinnung von Antiseren gegen RNA-Polymerase

Immunisierung:

Die Immunisierung der Kaninchen wurde am Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung durchgeführt. Es wurde ein Immunisierungsschema nach Linn et al. (1973) benutzt. 1,2 mg RNA-Polymerase in 0,5 ml Puffer C (Burgess, 1969a) wurden mit dem gleichen Volumen komplettem Freunds Adjuvans gemischt und in die Pfoten eines Kaninchens injiziert. Zwei weitere Injektionen von je 0,6 mg RNA-Polymerase in Freunds inkomplettem Adjuvans erfolgten vier und sechs Wochen später. Nach der letzten Injektion wurde in Abständen von fünf Tagen Blut aus der Ohrvene entnommen und gesammelt. Nach 20 Tagen wurde das Kaninchen durch Öffnen der Halsschlagader entblutet.

Nach der Entnahme wurde das Blut einige Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend zur Entfernung des Blutkuchens zentrifugiert. Das klare Serum wurde mit einigen Tropfen einer 1 %igen Methiolatlösung versetzt und bei -20°C aufbewahrt.

Anreicherung von Immunglobulin:

Immunglobulin G wurde in Anlehnung an Campbell et al. (1970) und Linn et al. (1973) isoliert. 20 ml Antiserum wurden mit einer bei Raumtemperatur gesättigten Ammoniumsulfatlösung pH 7,3 auf 50 % Sättigung gebracht und 3 h bei 4°C gerührt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, GSA, 30 min bei 3 000 UpM und 4°C) und anschließend in 5 ml 0,03 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 gelöst. Nach Dialyse gegen 2 x 2 l des gleichen Puffers wurde die Lösung auf eine DEAE Cellulosesäule (5,7 cm^2 x 15 cm), äquilibriert mit 0,03 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,0, aufgetragen. Die Säule wurde mit 300 ml Äquilibrierungspuffer gewaschen, und das Eluat in 5 ml Fraktionen aufgefangen. Das Immunglobulin wird nicht absorbiert und erscheint im Durchlauf. Die Protein enthaltenden Fraktionen des Durchlaufs (Absorption gemessen bei 280 nm) wurden vereinigt, mit Ammoniumsulfatlösung gefällt (50 % Sättigung), 30 min bei 4°C gerührt und abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 2 ml 0,03 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 mit 0,1 M NaCl gelöst und anschließend gegen den gleichen Puffer dialysiert. Die Reinheit der Präparationen wurde durch Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese überprüft. Sie enthielten außer den schweren und leichten Ketten des Immunglobulins keine weiteren Serumproteine (Fig. 2). Die Präparationen wurden bei -20°C aufbewahrt.

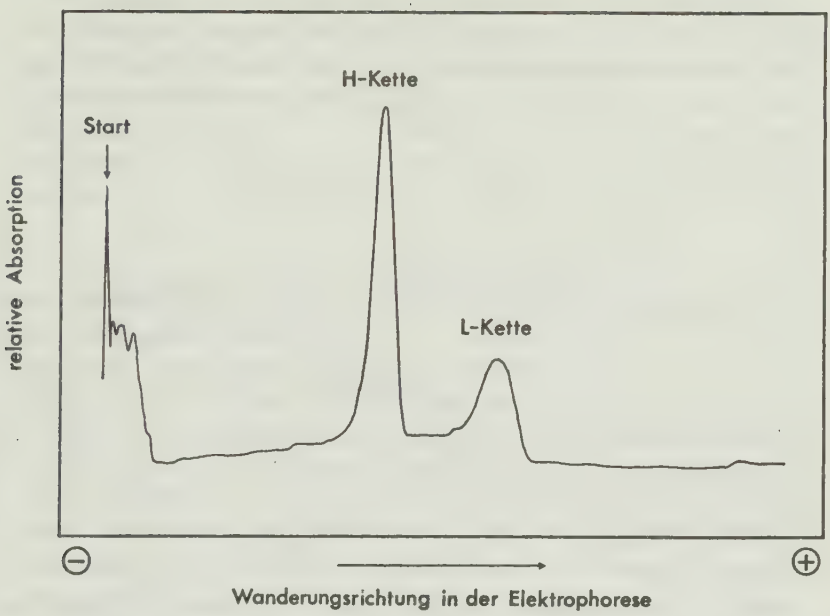


Fig. 2 Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese des angereicherten Immunglobulins

30 µg Immunglobulin wurden in 50 µl Probenpuffer (Burgess, 1969b) mit 5 % 2-Mercaptoäthanol und 6 M Harnstoff 15 min auf 100°C erhitzt und einer Elektrophorese in einem dodecylsulfathaltigen, 6 %igen Polyacrylamid-Rundgel unterworfen (vergl. Methoden, Kap. 5).

Charakterisierung der Antiseren:

Der Titer der Antiseren wurde durch Komplementfixierung bestimmt. Dabei wird als Titer der Faktor definiert, um den das Antiserum verdünnt werden muß, um mit dem Antigen eine maximale Komplementfixierung von 50 % zu erreichen. Außerdem wurde die Hemmwirkung der Antiseren auf die en-

zymatische Aktivität der RNA-Polymerase überprüft. Aus den in Tab. 1 zusammengestellten Daten geht hervor, daß der Anteil an hemmenden Antikörpern im Anti-^{m}holo-Serum geringer ist als in den E. coli-spezifischen Antiseren.

Tab. 1 Titerbestimmung der Antiseren

	Verdünnung bei 50 % Komplementfixierung		50 % Hemmung von 12 µg RNA-Polymerase	
	Antiserum	IgG angereichert	Antiserum (µl)*	IgG angereichert (µg)
Anti-^{e}core	1 : 200	1 : 420	12	116
Anti-^{e}holo	1 : 650	1 : 4 800	4	<70
Anti-^{m}holo	1 : 300	1 : 630	14	334

*Der Proteingehalt von Kaninchenserum beträgt im allgemeinen 60 - 80 mg/ml.

10. Immundiffusion

Die Durchführung des Doppeldiffusionstests erfolgte nach der Methode von Ouchterlony (1962). Eine 0,7 %ige, 80°C heiße Agaroselösung in 0,03 M Veronal-Puffer pH 8,6 wurde auf entfetteten Objektträgern bis zu einer Schichtdicke von 2 - 3 mm ausgegossen. Nachdem die Agarose erstarrt war, wurden die Probenlöcher eingestanzt, die Proben mit einer Konstriktionspipette aufgetragen und bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Sobald sich Präzipitationslinien ausgebildet hatten (nach etwa 1 - 3 Tagen), wurden die Objektträger 2 - 3 Tage bei 4°C in eine 0,9 %ige Kochsalz-

lösung gestellt, um das nicht präzipitierte Protein herauszuwaschen. Anschließend wurde noch eine Stunde mit H_2O gespült. Zum Färben der Präzipitate wurden die Objektträger ca. 10 min in eine Lösung von 0,5 % Amidoschwarz in Methanol : Eisessig = 9 : 1 getaucht. Nach dem Entfärben in Methanol : Eisessig = 9 : 1 wurden die Objektträger an der Luft getrocknet.

11. Immunpräzipitation nach Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Versuche wurden in Anlehnung an eine Vorschrift von Stumph et al. (1974) durchgeführt. Anstelle von Rundgelen wurden wegen der besseren Trenneigenschaften Dodecylsulfat-Plattengele mit einem linearen Acrylamidgradienten verwendet. Die Gele wurden nach der Elektrophorese mit einer Rasierklinge in Streifen geschnitten. Einige Streifen wurden zum Vergleich mit Coomassie Brillant Blue G 250 angefärbt; die anderen wurden in passende Tröge mit 1 ml ungereinigtem Antiserum gelegt, so daß sie von allen Seiten mit Antiserum umgeben waren. Die Tröge waren mit einem Glasboden (Objektträger) versehen und dienten gleichzeitig als Küvette für die densitometrische Aufzeichnung der Präzipitationsbanden. Auf diese Weise konnten zusätzliche Manipulationen an den Gelen vermieden werden, die häufig zu einer Beschädigung der Banden führen, da die Präzipitate nur locker an der Geloberfläche haften.
Nach 2 Tagen Inkubation bei 4°C wurden die Gelstreifen 3 Tage in 5 x 5 ml 0,01 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,2 mit 0,9 % NaCl im Trog gewaschen und dann weitere 2 Tage in 1 ml fluoreszenzmarkiertem Antiserum aus Ziege gegen Kaninchenimmunglobulin inkubiert. Die geeigneten Konzentrationen an fluoreszenzmarkiertem Immunglobulin müssen von Fall zu Fall in einer Verdünnungsreihe bestimmt wer-

den, da ein Überschuß an Antikörper das Präzipitat aus dem Gel herauslöst. Verdünnungen im Bereich von 1 : 15 bis 1 : 20 erwiesen sich in unserem Fall als günstig. Die Gele wurden nach der Inkubation noch einmal 3 Tage mit Natriumphosphatpuffer gewaschen, getrocknet und wie in Kap. 7 beschrieben unter Beleuchtung mit ultaviolettem Licht fotographiert.

12. Mikrokomplementfixierung

Der Komplementfixierungstest wurde im Mikrolitersystem nach der Methode von Ringelmann et al. (1969) durchgeführt.

Aufstellung der verwendeten Lösungen:

a) Stammlösungen

1. VBS (veronal buffered saline) konzentriert nach Mayer (pH 7,3; Ionenstärke 0,15 μ)
   25 mM Natrium-5,5-Diäthylbarbiturat
   0,75 mM NaCl
   17,3 mM HCl

2. Saccharose-Stammlösung (pH 7,3)
   486,1 g/l Saccharose
   25 mM Natrium-5,5-Diäthylbarbiturat
   17,3 mM HCl

3. 0,2 M EDTA-Lösung (pH 7,65)

4. 0,3 M $CaCl_2$

5. 2,0 M $MgCl_2$

6. Gelatine (10 %)
   (im Wasserbad bei 56°C lösen)

Die Saccharose-Stammlösung wurde eingefroren aufbewahrt, die übrigen Lösungen bei 4°C. Die Gelatinelösung wurde bei Bedarf frisch hergestellt.

b) Gebrauchspuffer

1. VBS (pH 7,3)
   200 ml VBS konzentriert
   1 ml 0,3 M $CaCl_2$
   1 ml 2,0 M $MgCl_2$
   795 ml H_2O
   3 ml 10 %ige Gelatine

2. VBS-EDTA (pH 7,5 - 7,6)
   50 ml 0,2 M EDTA
   80 ml VBS konzentriert
   368,5 ml H_2O
   1,5 ml 10 %ige Gelatine

3. VBS-Saccharose nach Rapp (pH 7,3; Ionenstärke 0,065 μ)
   60 ml Saccharose-Stammlösung
   40 ml VBS konzentriert
   0,5 ml 0,3 M $CaCl_2$
   0,5 ml 2,0 M $MgCl_2$
   397,5 ml H_2O
   1,5 ml 10 %ige Gelatine

Die Puffer wurden bei 56°C gelöst, und das pH nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit 1 n NaOH bzw. 1 n HCl eingestellt. Die Lösungen sind ein bis zwei Wochen haltbar.

Sensibilisierung der Erythrocyten:

Mit einer Spritze wurden 10 ml Hammelblut steril aus der Vorratsflasche entnommen und in einer Tischzentrifuge bei 3 000 UpM 10 min zentrifugiert. Der Rückstand wurde dreimal gründlich mit 60 - 80 ml VBS-EDTA-Puffer gewaschen,

zentrifugiert und zum Schluß in 40 ml VBS-EDTA-Puffer suspendiert. Die Anzahl der Erythrocyten pro ml wurde mit Hilfe einer Eichgeraden photometrisch bestimmt (Rupprecht, 1978). Dazu wurden 0,1 ml der gewaschenen Erythrocyten in 20 ml H_2O aufgenommen, geschüttelt, und die Extinktion bei 412 nm gemessen. 1 x 10^9 Erythrocyten pro ml entsprechen bei einer Verdünnung von 1 : 200 in H_2O einer Extinktion bei 412 nm zwischen 0,44 und 0,45. Die Erythrocytensuspension wurde mit VBS-EDTA-Puffer auf diesen Wert eingestellt.

Zur Beladung mit Antikörper gegen Hammelerythrocyten wurden 24 ml der Erythrocytensuspension im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Dann wurde eine Lösung aus 0,1 ml Anti-Schaf-Hämolysin (Titer 1 : 4 000) in 24 ml VBS-EDTA-Puffer unter kräftigem Schütteln langsam zugegeben. Die Suspension wurde anschließend 20 min bei 37°C inkubiert und dabei mehrmals geschüttelt. Nach der Beladung wurden die Erythrocyten abzentrifugiert, zweimal mit VBS-EDTA, einmal mit VBS und zweimal mit VBS-Saccharose gewaschen. Die Erythrocyten wurden dann zunächst in 35 ml VBS-Saccharose aufgenommen und nach dem Ergebnis des nachstehend beschriebenen Tests mit dem gleichen Puffer verdünnt:

0,1 ml eines mit VBS-Puffer 1 : 4 verdünnten Aliquots wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1,2 ml H_2O versetzt, geschüttelt und in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 2 min zentrifugiert. Nach Verdünnung und Lyse sollten die Erythrocyten eine Extinktion bei 412 nm zwischen 0,95 und 1,0 aufweisen.

Die sensibilisierten Erythrocyten wurden mit Merthiolat (0,01 %) konserviert und bei 4°C aufbewahrt. Die Erythrocytensuspension war in der Regel 3 - 4 Tage verwendungsfähig. Die Suspension wurde verworfen, wenn sich eine deutliche Hämolyse durch Rotfärbung des Überstandes zeigte, oder wenn bei der negativen Erythrocytenkontrolle (vergl. S. 25) die Extinktion über 0,07 lag.

Komplementtitration:

Das Meerschweinchenkomplement wurde in Portionen von 0,2 ml eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Aktivität bleibt dabei 6 - 12 Monate annähernd konstant. Nach dem Auftauen wurde die Aktivität vor jedem Versuchsansatz neu bestimmt. Dazu wurden vom Meerschweinchenkomplement Verdünnungen im Bereich von 1 : 50 bis 1 : 300 hergestellt. In Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden je 0,1 ml der verdünnten Komplementlösung und 0,2 ml VBS-Puffer pipettiert, mit dem Whirlimix geschüttelt und 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Lösungen ins Eisbad gestellt, mit 0,1 ml sensibilisierten Schaf-Erythrocyten (mit VBS 1 : 4 verdünnt) versetzt, geschüttelt und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Nach etwa 10 min Inkubation wurden die Proben noch einmal geschüttelt. Zur Beendigung der Hämolyse wurden die Proben ins Eisbad gestellt, mit 0,9 ml eiskaltem VBS-Puffer versetzt, geschüttelt und 2 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Extinktion des Überstandes wurde gegen VBS-Puffer bei 412 nm in 1 ml Küvetten gemessen.
Neben den Proben wurden noch folgende Kontrollen mitgeführt:

1. negative Erythrocyten-Kontrolle
   0,3 ml VBS; 30 min Inkubation
   0,1 ml sensibilisierte Erythrocyten; 30 min Inkubation
   0,9 ml VBS

2. vollständige Hämolyse
   0,3 ml VBS; 30 min Inkubation
   0,1 ml sensibilisierte Erythrocyten; 30 min Inkubation
   0,9 ml H_2O

Der Hämolysegrad wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Hämolyse} = \frac{E_{412}\ \text{verdünntes Komplement}}{E_{412}\ \text{vollständige Hämolyse}} \times 100$$

mit E_{412} = Extinktion des Überstandes bei 412 nm

Die Abhängigkeit des Hämolysegrades von der Komplementverdünnung ist in einem Beispiel in Fig. 3 dargestellt.

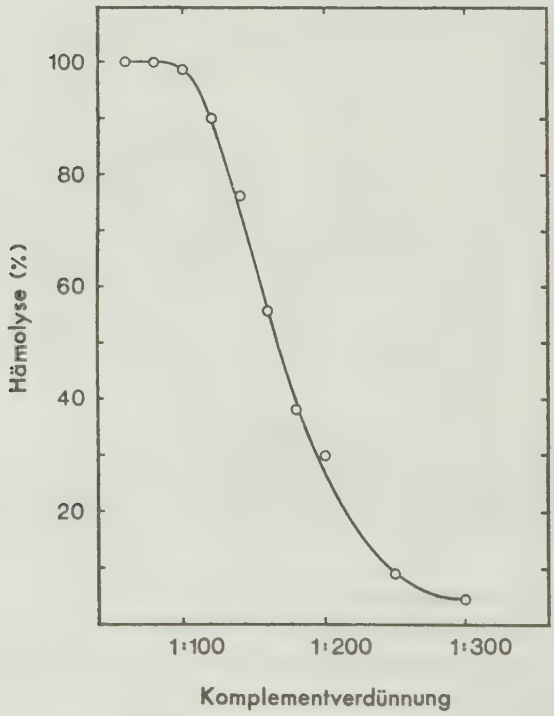


Fig. 3 Titration des Meerschweinchenkomplements

Im Mikrokomplementfixierungstest wurde in der Regel eine Komplementverdünnung eingesetzt, die 85 - 90 % der vollständigen Hämolyse entsprach.

Reaktionsansatz für die Komplementfixierung:

Die Komplementbindungsreaktion erfolgte in Form einer "Schachbrett-Titration", d. h. es wurden in einer Reihe die Antiserumkonzentrationen und in der dazu senkrechten Reihe die Antigenkonzentrationen variiert. Von den Antiseren wurden je nach Titer Verdünnungen in logarithmischer Reihe von 1 : 2 bis 1 : 8192 mit VBS-Puffer hergestellt. RNA-Polymerase und ihre Untereinheiten wurden in Mengen von 0,02 - 3,2 µg im Test eingesetzt. Bakterienrohextrakte wurden in der Regel 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32 und 1 : 64 mit VBS-Puffer verdünnt. Die Reaktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Ag + Ak ⟶ AgAk
   0,1 ml Antigen (Ag) und 0,1 ml Antiserum (Ak) werden im Eisbad in Eppendorf-Reaktionsgefäße zusammenpipettiert, mit dem Whirlimix geschüttelt und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach etwa 10 min Inkubationszeit werden alle Proben noch einmal gut durchgeschüttelt. Die Reaktion wird im Eisbad gestoppt.

2. AgAk + C ⟶ AgAkC + freies C
   Zum Reaktionsansatz werden 0,1 ml Komplement (C) in der zuvor durch Titration ermittelten geeigneten Verdünnung (siehe oben) zugesetzt und die Proben wie oben beschrieben 30 min bei 37°C inkubiert.

3. freies C + EA ⟶ Hämolyse
   In den Reaktionsansatz werden 0,1 ml 1 : 4 mit VBS-Puffer verdünnte sensibilisierte Erythrocyten (EA) pipettiert und die Proben wie oben beschrieben 30 min bei 37°C inkubiert.

4. Die Hämolyse wird im Eisbad durch Zusatz von 0,9 ml eiskaltem VBS abgebrochen. Die Proben werden geschüttelt und in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Extinktion des Überstandes wird bei 412 nm gemessen.

Bei jedem Reaktionsansatz wurden nachstehende Kontrollen mitgeführt:

Antigen-Kontrolle A
Jeweils die höchste im Test eingesetzte Konzentration an RNA-Polymerase oder Rohextrakt.

Antiserum-Kontrolle B
Jeweils die höchste im Test eingesetzte Konzentration an Antiserum. Bei Verdünnungen von 1 : 2 bis 1 : 16 wurden alle Antiserumkonzentrationen getestet.

Komplement-Kontrolle C
Entsprechend der im Test eingesetzten Konzentration.

Vollständige Hämolyse D
(vergl. S. 25)

Negative Erythrocyten-Kontrolle E
(vergl. S. 25)

Die Kontrollen wurden nach dem Schema in Tab. 2 ausgeführt. Gewöhnlich sollte die Extinktion der Antiserum-, Antigen- und Komplement-Kontrolle sehr ähnlich sein, wenn Antiserum oder Antigen nicht durch unspezifische Effekte zu einer Erhöhung (Prokomplementarität) oder zu einer Erniedrigung der Hämolyse (Antikomplementarität) führen. Die Extinktion der vollständigen Hämolyse muß höher als die der Komplement-Kontrolle sein; dies ist der Beweis dafür, daß kein Überschuß an Komplement vorliegt. Das in ungereinigten Antiseren vorhandene Kaninchenkomplement muß vor der Verwendung im Komplementbindungstest durch Erhitzen (60°C, 20 min) inaktiviert werden.

Tab. 2 Kontrollen im Mikrokomplementfixierungstest

	A	B	C	D	E
VBS	0,1 ml	0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml	0,3 ml
Antiserum	-	0,1 ml	-	-	-
Antigen	0,1 ml	-	-	-	-
Komplement	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	-	-
sensibilisierte Erythrocyten	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
VBS	0,9 ml	0,9 ml	0,9 ml	-	0,9 ml
H_2O	-	-	-	0,9 ml	-

Auswertung der Komplementbindungsreaktion:

Die Menge des gebundenen Komplements in % wurde nach Champion et al. (1974) berechnet:

$$C_{geb.} = \frac{E_{412}\ \text{Antiserum-Kontrolle} - E_{412}\ \text{Probe}}{E_{412}\ \text{Antiserum-Kontr.} - E_{412}\ \text{neg.Ery.-Kontr.}} \times 100$$

mit E_{412} = Extinktion des Überstandes bei 412 nm

Zur quantitativen Auswertung der Kreuzreaktion zweier verwandter Antigene wurden die Prozent gebundenen Komplements gegen die Antigenmenge bei konstanter Antiserumkonzentration aufgetragen (Fig. 4a). Man erhält auf diese Weise eine Schar glockenförmiger Komplementfixierungskurven, deren Maxima mit steigender Antiserumverdünnung abnehmen.

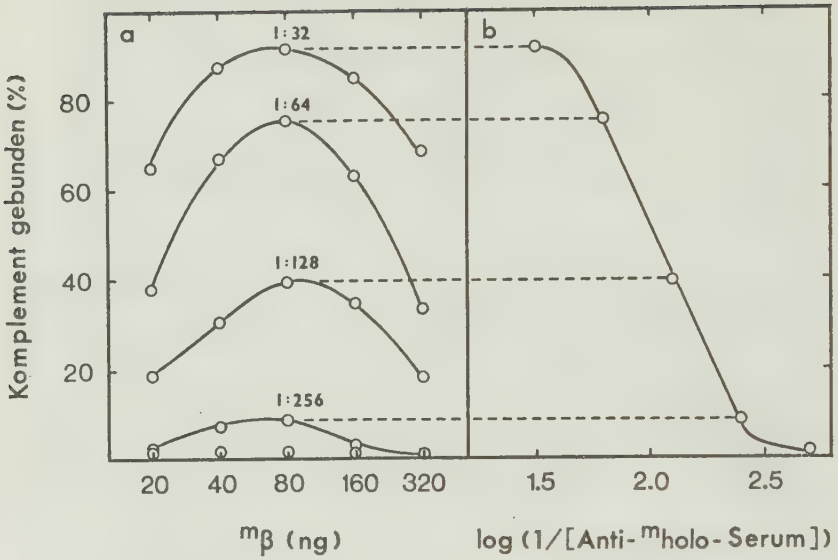


Fig. 4 Auswertung eines Komplementbindungstests

a) Komplementfixierungskurven bei verschiedenen Antiserumkonzentrationen
b) Abhängigkeit der maximalen Komplementbindung von der Antiserumkonzentration

Trägt man nun die maximale Komplementfixierung dieser Kurven gegen den Logarithmus der jeweiligen Antiserumverdünnung auf, so erhält man die in Fig. 4b dargestellte Abhängigkeit von der Antiserumkonzentration.
Aus dem Abstand der Kurven des homologen und des heterologen Antigens läßt sich die Immunologische Distanz graphisch bestimmen (Fig. 5). Dazu wurden bei jeweils der gleichen Menge gebundenen Komplements (in der Regel bei 50 % Komplementfixierung) die entsprechenden Antiserum-

konzentrationen abgelesen und die Differenz mit dem Faktor 100 multipliziert.

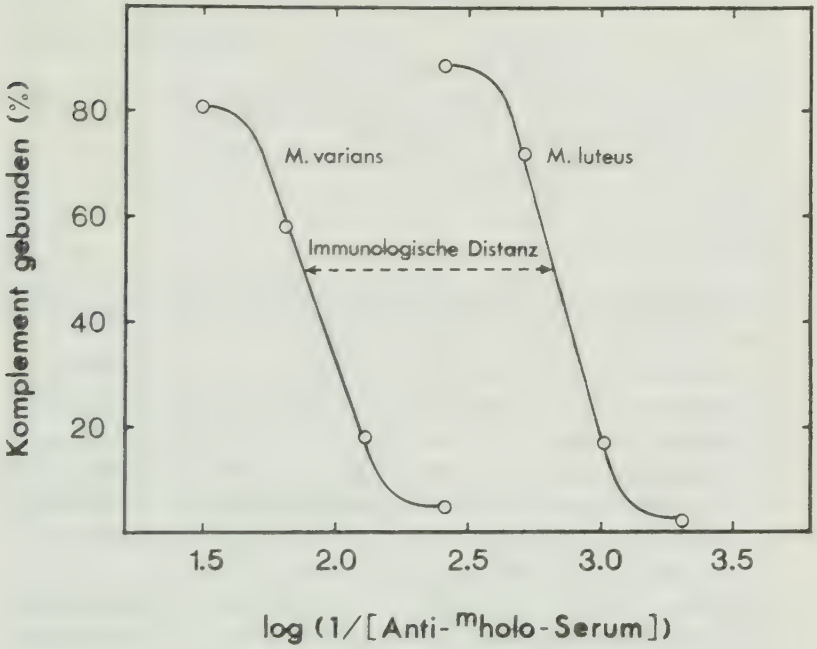


Fig. 5 Graphische Bestimmung der Immunologischen Distanz

Die Immunologische Distanz kann auch nach Champion et al. (1975) aus der Peakhöhe einer der Komplementbindungskurven (Fig. 4a) des homologen und des heterologen Antigens berechnet werden, vorausgesetzt die Steigung der Kurven in Fig. 5 ist die gleiche:

$$\text{Immunologische Distanz} = 100 \left[\frac{y_H - y_h}{m} + \log \frac{x_h}{x_H} \right]$$

mit y_H (y_h) = % gebundenes Komplement im Maximum der Komplementbindungskurve des homologen (heterologen) Antigens

x_H (x_h) = Antiserumkonzentration des homologen (heterologen) Antigens

m = Steigung

Reproduzierbarkeit:

Folgende Faktoren können die Reproduzierbarkeit des Komplementbindungstests beeinträchtigen:

1. Das Indikatorsystem (Komplement, sensibilisierte Erythrocyten) ist instabil und verändert sich innerhalb weniger Tage.
2. Der Titer der Antiseren nimmt bei längerer Lagerung ab.
3. Der Hämolysegrad wird bei unterschiedlich großen Reaktionsansätzen durch Variationen in den Reaktionsbedingungen (Temperatur, Zeit) beeinflußt.

Als Folge davon können bei Versuchen, die zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden, Verschiebungen der Komplementbindungskurven zu höheren oder niedereren Antikörperkonzentrationen auftreten.
Um diesen Fehler auszugleichen wurde daher bei jedem Versuchsansatz das jeweilige homologe Antigen (E. coli Holoenzym bzw. M. luteus Holoenzym) als Referenz mitgetestet. Außerdem wurde die Immunologische Distanz zwischen zwei Antigenen immer nur anhand von Komplementbindungskurven bestimmt, die gleichzeitig im selben Versuch gemessen wurden. Unter diesen Bedingungen erwiesen sich selbst die kleinsten gemessenen Immunologischen Distanzen als exakt reproduzierbar.

Antikomplementarität:

Sowohl Antigene als auch Antiseren können im Komplementbindungstest pro- oder antikomplementäre Eigenschaften zeigen (vergl. S. 28). Bei Antigenen treten diese Effekte hauptsächlich dann auf, wenn verunreinigte Proteine oder Bakterienrohextrakte in hohen Konzentrationen im Test eingesetzt werden, und sind auf komplementbindende Aktivitäten, z. B. Bakterienendotoxin, oder auf die Anwesenheit von Salzen und anderen störenden Substanzen, die eine unspezifische Hämolyse verursachen, zurückzuführen (Champion et al., 1974). In unserem Fall konnten diese Effekte durch eine partielle Anreicherung der Bakterienrohextrakte und Dialyse gegen einen Puffer mit niederer Ionenstärke behoben werden (vergl. Methoden, Kap. 1).

In der vorliegenden Arbeit wurden als Antiseren in der Komplementbindungsreaktion ausschließlich angereicherte Immunglobulinfraktionen verwendet. In hohen Konzentrationen eingesetzt, erwiesen sich diese Lösungen als stark antikomplementär. Möglicherweise beruht dieser Effekt auf einer spontanen Aggregation des Immunglobulins, die zu der selben Konformationsänderung im FC-Bereich führt, wie die Reaktion mit dem Antigen. Diese Antikomplementarität ließ sich durch Erhitzen des Antiserums auf 56°C weitgehend beseitigen (Fig. 6), trat jedoch nach längerer Lagerung der Antiseren bei -20°C erneut auf.

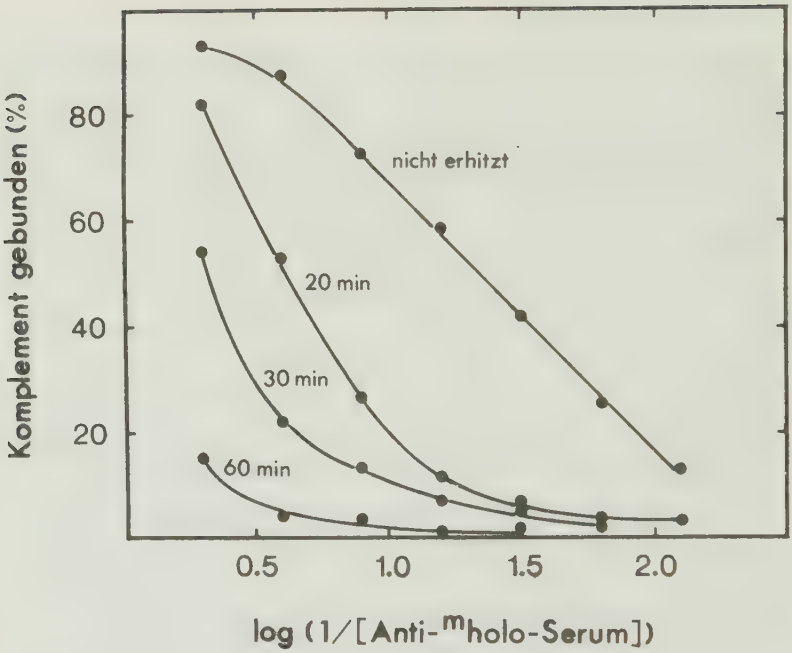


Fig. 6 Antikomplementarität von angereichertem Anti-^{m}holo-Serum

Das Antiserum wurde auf 56°C erhitzt, und zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und wie auf S. 28 unter Antiserum-Kontrolle beschrieben getestet.

Ergebnisse

I. Peptidchemische Untersuchungen

Untersuchungen über die Primärstruktur isofunktioneller Proteine aus verschiedenen Organismen haben schon lange zur Entdeckung verwandtschaftlicher Beziehungen geführt (Dayhoff, 1972). Eine einfache Methode, um Homologien in der Aminosäuresequenz zweier Proteinketten festzustellen, ist der Vergleich ihrer Peptidkarten nach spezifischem Abbau durch eine Protease oder durch ein chemisches Agens.

1. Spaltung mit Trypsin

Die Primärstruktur der Untereinheit α der RNA-Polymerase aus E. coli ist bekannt (Ovchinnikov et al., 1977). E. coli α enthält 23 Arginin- und 16 Lysinreste, darunter drei durch Trypsin nicht spaltbare Lysin-Prolin- (10-11, 125-126, 246-247) und zwei Arginin-Prolin-Bindungen (166-167, 255-256), außerdem noch vier weitere nur sehr schwer zu spaltende Bindungen, nämlich Lys-Asp (95-96), Lys-Val (145-146), Lys-Leu (200-201) und Lys-Lys (297-298). Wenn man berücksichtigt, daß bei einer unvollständigen Hydrolyse dieser Bindundungen anstelle von zwei Peptiden drei Peptide entstehen können, so sind beim tryptischen Abbau von E. coli α mindestens 31, maximal jedoch 39 Spaltstücke zu erwarten. Ein zweidimensionaler Fingerprint sollte daher eine gute Auflösung der Peptidflecken ergeben.
Um möglichst alle Peptide zu erfassen, wurden zwei Trennsysteme gewählt, die sich sowohl im pH-Wert des zur Elektrophorese (1. Dimension) verwendeten Puffers als auch in der Zusammensetzung des Laufmittels für die Chromato-

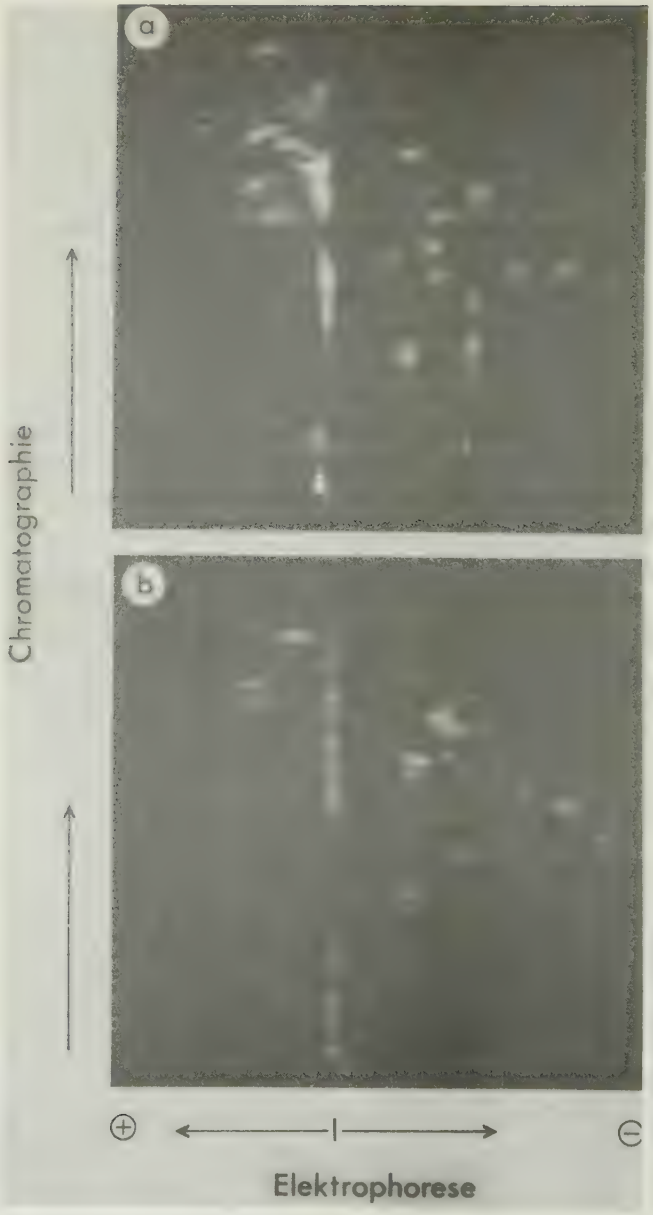
graphie (2. Dimension) deutlich unterscheiden. Die aufgetrennten Peptide wurden mit Fluorescamin (4-Phenylspiro[furan-2(3H),1'-phtalan]-3,3'dion) angefärbt, das im Vergleich zu Ninhydrin vier- bis fünffach empfindlicher ist (Mendez und Lai, 1974; Stephens, 1978). Fluorescamin reagiert mit den Lysin-ε-Aminogruppen und den endständigen α-Aminogruppen der Peptidketten (Stein et al., 1973).
Um die Peptidmuster der Untereinheit α von E. coli und M. luteus besser vergleichen zu können, wurde auch ein Fingerprint von einem Gemisch aus beiden Untereinheiten hergestellt. Auf diese Weise konnten Unsicherheiten vermieden werden, die dadurch entstehen, daß die Versuchsbedingungen bei der Auftrennung nicht exakt reproduziert werden können.

Fingerprint in System I

Die Elektrophorese bei annähernd neutralem pH (Perham, 1967) in Kombination mit einem sauren, hydrophoben Laufmittel (Rueckert und Duesberg, 1966) ergibt eine gute Auftrennung der basischen Peptide, während die neutralen und sauren Peptide weniger befriedigend aufgelöst werden. Im folgenden werden daher nur die Peptide mit positiver Ladung betrachtet.
Auf dem Fingerprint der Untereinheit $^{e}\alpha$ sind im basischen Bereich 17 Flecken zu erkennen (Fig. 7a), $^{m}\alpha$ zeigt 22 Flecken (Fig. 7b) und der Mischfingerprint aus beiden Untereinheiten 32 (Fig. 7c). $^{e}\alpha$ und $^{m}\alpha$ haben also nur sieben Peptidflecken gemeinsam. Zur Verdeutlichung ist die Verteilung der basischen Peptide in Fig. 8 noch einmal schematisch dargestellt. Zwei der gemeinsamen Flecken können aufgrund ihrer Wanderungsstrecke in der Elektrophorese als die Aminosäuren Arginin und Lysin identifiziert werden.

Fingerprint in System II

System II unterscheidet sich von System I dadurch, daß die Elektrophorese bei pH 1,9 anstatt bei pH 6,5, also in sehr saurem Milieu, durchgeführt wurde (Fujiki et al., 1976), und daß bei der Chromatographie ein Laufmittel verwendet wurde, das weniger Butanol, datür aber zusätzlich Pyridin als basische Komponente enthielt (Bates und Perham, 1975). Da bei der Elektrophorese aufgrund des niederen pH-Werts alle Peptide positiv geladen sind, ergibt System II eine vollständige Auflösung aller Peptidflecken. Außerdem bleibt bei diesem Verfahren nur wenig färbbares Material an der Auftragstelle zurück. Nachteilig ist jedoch, daß der Mischfingerprint aus beiden Untereinheiten wegen der Vielzahl an Flecken schwieriger zu interpretieren ist. Man findet etwa 65 Peptide (Fig. 9c und Fig. 10c), während der Fingerprint von $^{e}\alpha$ allein 32 Flecken (Fig. 9a und Fig. 10a) und von $^{m}\alpha$ 46 Flecken (Fig. 9b und Fig. 10b) zeigt. Der Anteil an gemeinsamen Peptidflecken ist mit 13 von insgesamt 65 ähnlich gering wie bei System I im Bereich der basischen Peptide. Wenn man annimmt, daß die Größenverteilung der gemeinsamen Peptide und die der nicht gemeinsamen Peptide ungefähr gleich ist, dann ist ihre Anzahl ein Anhaltspunkt für den Anteil der gemeinsamen Aminosäuresequenz an der Gesamtsequenz. Aus den oben angeführten Zahlen ergibt sich dann, daß höchstens 1/4 bis 1/3 der Aminosäuresequenz von $^{e}\alpha$ und $^{m}\alpha$ übereinstimmen kann. Wahrscheinlich ist der Anteil an gemeinsamen Peptiden noch geringer, da die Sequenz von Peptiden, die sich bei der Elektrophorese und Chromatographie gleich verhalten und im Fingerprint daher an gleicher Position zu finden sind, nicht identisch sein muß.


a
b
Chromatographie
⊕
⊖
Elektrophorese

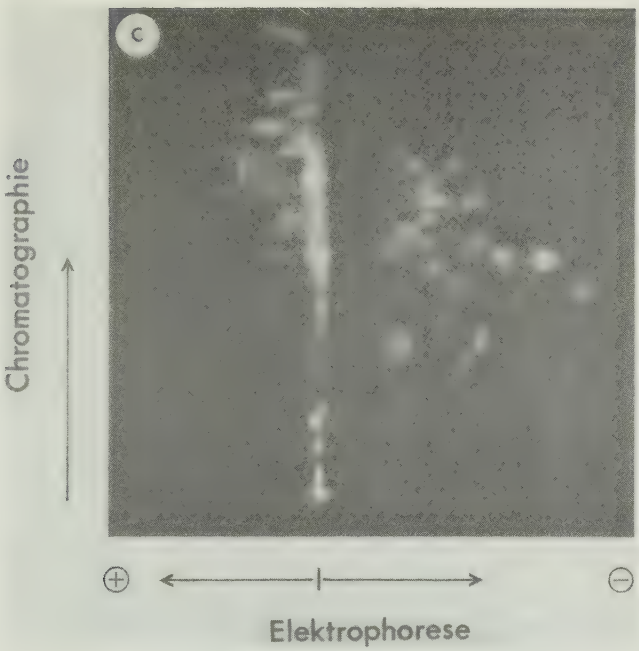
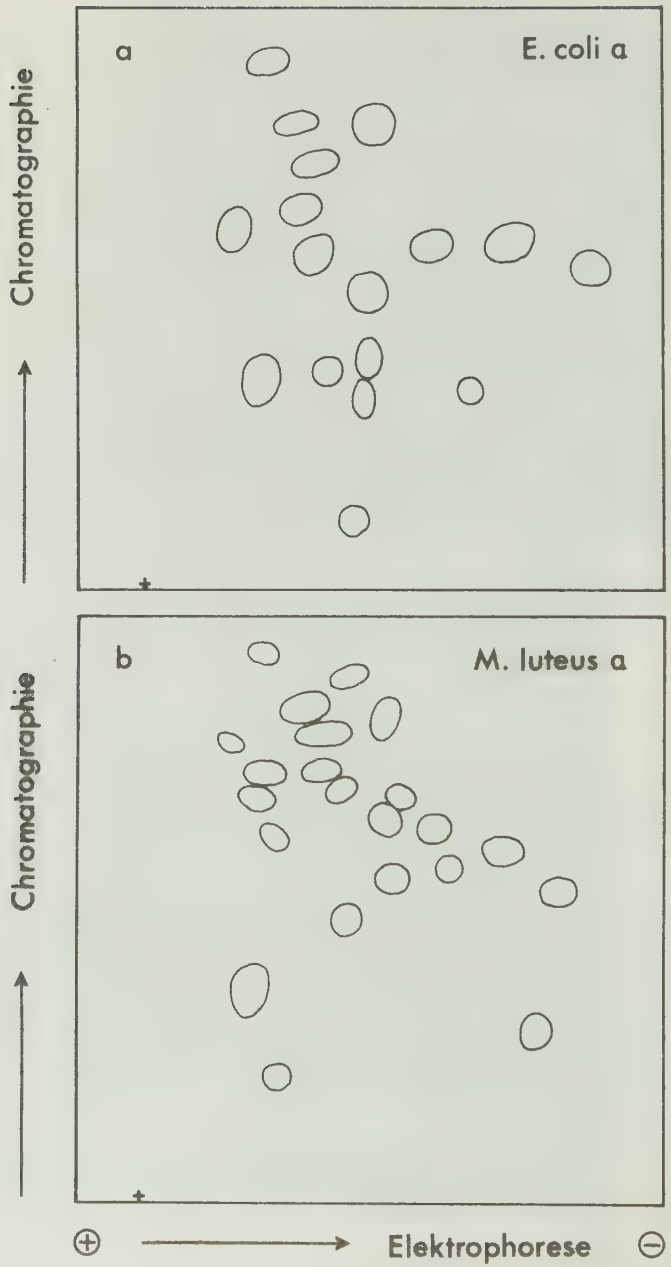


Fig. 7 Auftrennung der tryptischen Peptide in System I
a) $^{e}_{\alpha}$ b) $^{m}_{\alpha}$ c) $^{e}_{\alpha}$ + $^{m}_{\alpha}$

Die tryptische Spaltung der α-Untereinheiten und die zweidimensionale Auftrennung der Peptide auf Kieselgel-Dünnschichtplatten wurde nach den Angaben in Methoden, Kap. 7, durchgeführt.
1. Dimension: Elektrophorese in Pyridin : Eisessig : H_2O = 25 : 1 : 225 (pH 6,5)
Dauer: 1 h 30 min, Spannung: 500 V, Stromstärke: 18 - 20 mA.
2. Dimension: Chromatographie in n-Butanol : Eisessig : Ameisensäure : H_2O = 4 : 1 : 1 : 1
Dauer: 5 - 6 h


a
E. coli a
Chromatographie
b
M. luteus a
Chromatographie
⊕
Elektrophorese
⊖

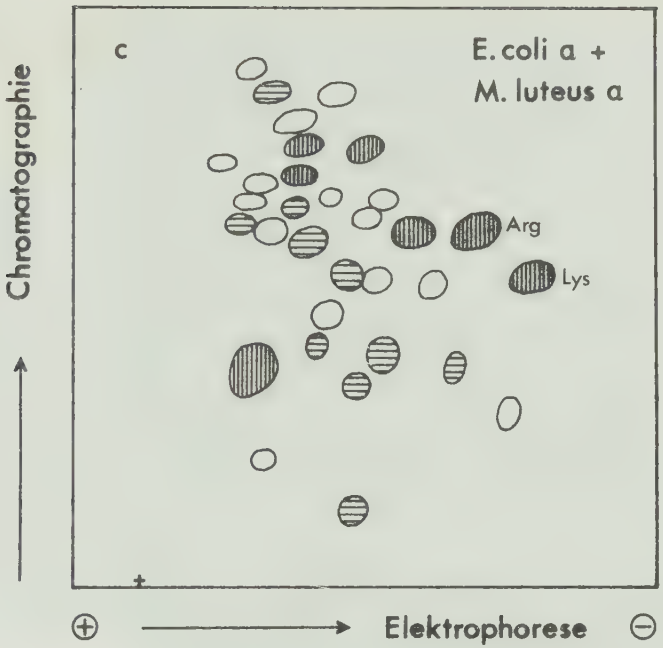
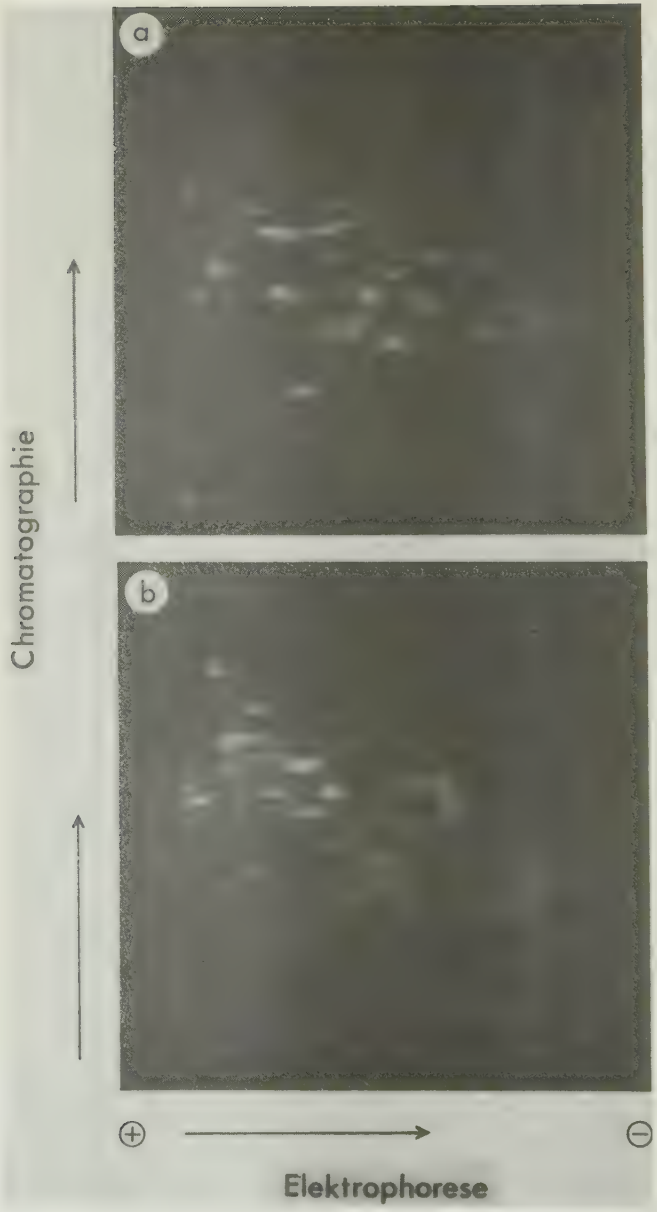


Fig. 8 Auftrennung der tryptischen Peptide in System I
(Schemat. Darst. der basischen Peptide von Fig. 7)

E. coli-spezifische Peptide

M. luteus-spezifische Peptide

gemeinsame Peptide


a
b
Chromatographie
⊕
⊖
Elektrophorese

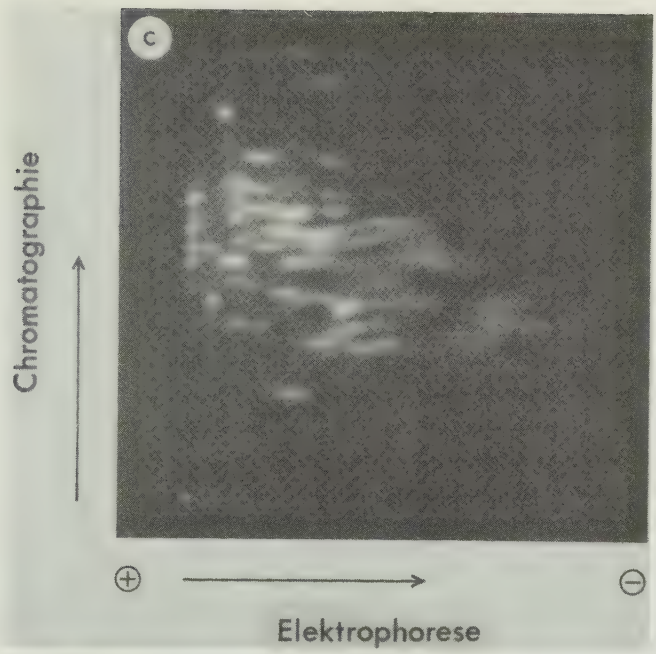
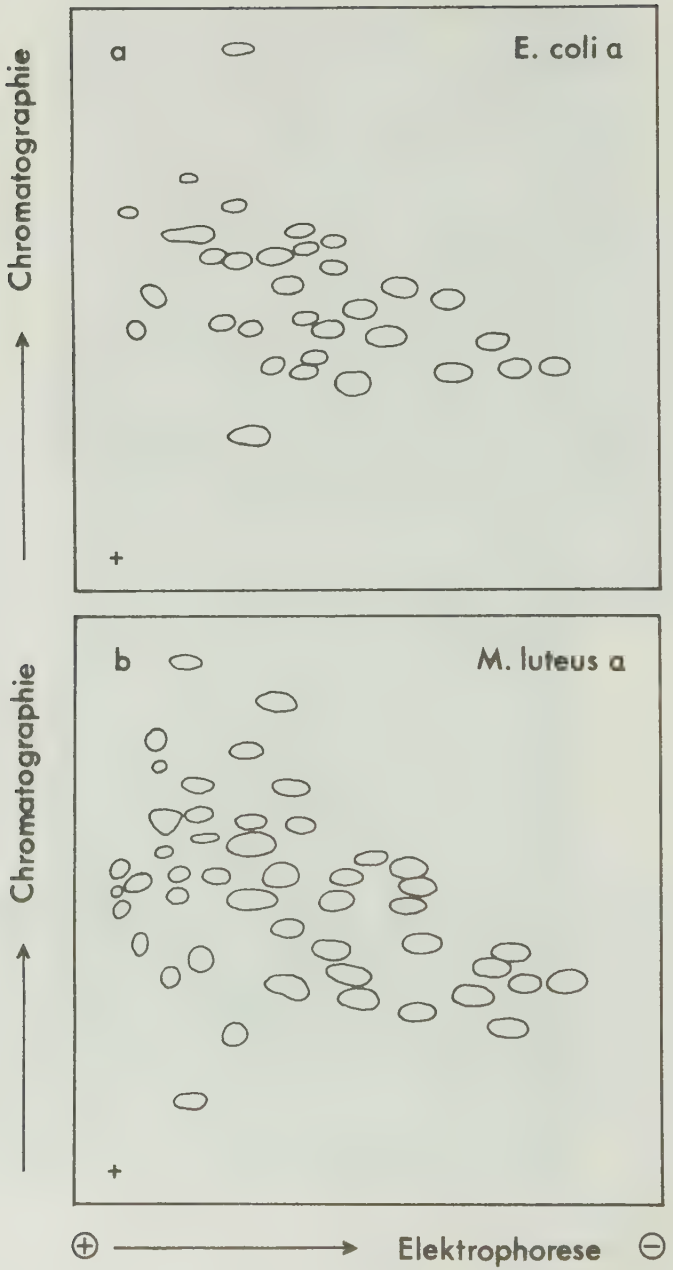


Fig. 9 Auftrennung der tryptischen Peptide in System II
a) $^{e}\alpha$ b) $^{m}\alpha$ c) $^{e}\alpha + {}^{m}\alpha$

Die tryptische Spaltung der α-Untereinheiten und die zweidimensionale Auftrennung der Peptide auf Kieselgel-Dünnschichtplatten wurde nach den Angaben in Methoden, Kap. 7, durchgeführt.
1. Dimension: Elektrophorese in 2 M Essigsäure, 0,6 M Ameisensäure (pH 1,9)
Dauer: 4 h, Spannung: 250 V, Stromstärke: 7 - 8 mA.
2. Dimension: Chromatographie in n-Butanol : Pyridin : Eisessig : H_2O = 15 : 10 : 3 : 12
Dauer: 6 ≙ 7 h


a
E. coli a
+
Chromatographie
b
M. luteus a
+
Chromatographie
⊕
Elektrophorese
⊖

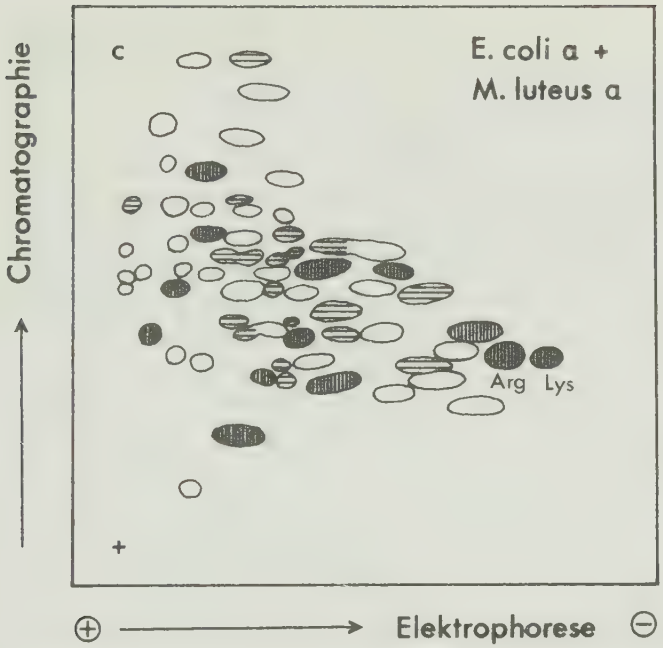


Fig. 10 Auftrennung der tryptischen Peptide in System II
(Schematische Darstellung von Fig. 9)

⊜ E. coli-spezifische Peptide

◯ M. luteus-spezifische Peptide

▨ gemeinsame Peptide

Daß die Untereinheit $^{m}\alpha$ wesentlich mehr tryptische Peptide ergibt als $^{e}\alpha$, obwohl sie eine größere negative Gesamtladung besitzt (Lill et al., 1975), kann vielleicht auf eine größere Zahl an durch Trypsin schwer zu hydrolysierenden Bindungen zurückgeführt werden. Es entstehen dann neben den vollständig gespaltenen Peptiden auch Bruchstücke, die noch eine oder mehrere spaltbare Bindungen enthalten. Für diese Annahme spricht auch, daß einige Flecken eine verhältnismäßig geringe Intensität zeigen.

2. Spaltung mit Bromcyan

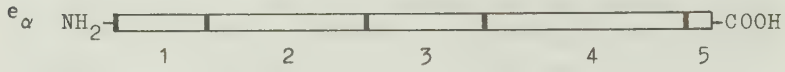
Eine weitere Möglichkeit, eine Polypeptidkette spezifisch abzubauen, ist die chemische Spaltung durch Bromcyan. Wenn man ein methioninhaltiges Protein unter sauren Bedingungen mit Bromcyan behandelt, so werden die Methioninreste zu Homoserinlakton umgeformt, und die Polypeptidkette wird an diesen Stellen gespalten (Gross und Witkop, 1962).
Da die Untereinheiten der RNA-Polymerase aus E. coli weit weniger Methionin als Lysin und Arginin enthalten (Burgess, 1969b; Fujiki und Zurek, 1975; Burgess et al., 1976), führt die Bromcyanspaltung zu verhältnismäßig großen Fragmenten, die sich in hochprozentigen Polyacrylamidgelen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat und Harnstoff auftrennen lassen (Krauss und Milman, 1977). Über die Charakterisierung durch die elektrophoretische Beweglichkeit hinaus bietet diese Methode den Vorteil, das Molekulargewicht der Peptide bestimmen zu können.

Untereinheit $^{e}\alpha$

Aus der bekannten Aminosäuresequenz der α-Untereinheit der E. coli RNA-Polymerase (Ovchinnikov et al., 1977) folgt, daß neben dem freien Methionin des Aminoendes fünf Bruchstücke mit den Molekulargewichten 12 411, 9 746, 7 270, 5 534 und 1 498 entstehen sollten. Bei einer unvollständigen Spaltung ist außerdem eine größere Anzahl von Kombinationen denkbar (Tab. 3). Tatsächlich kann man nach 7- bis 21-stündiger Reaktion mit Bromcyan in 70 %iger Ameisensäure (Steers et al., 1965) 12 bis 13 der 14 möglichen Fragmente als Proteinzonen unterschiedlicher Intensität im Polyacrylamidgel erkennen (Fig. 11). Es fehlt lediglich das kleinste Peptid, das mit einem Molekulargewicht von nur 1 498 im Gel nicht mehr nach-

zuweisen ist, und das Spaltstück mit dem Molekulargewicht 15 262, welches in einigen Gelen zwar noch als Schulter der nachfolgenden Bande visuell wahrnehmbar ist, jedoch vom Mikrodensitometer nicht mehr aufgelöst wird.

Tab. 3 Bromcyanfragmente der Untereinheit e_α



Bromcyanfragmente von e_α	Molekulargewicht		Abweichung (%)
	berechnet nach Ovchinnikov et al. (1977)	elektrophoretisch bestimmt (vgl. Fig. 12)	
e_α	36 512	36 500	-0,6
1 + 2 + 3 + 4	34 907 (35 038)*	32 800	-6,0
2 + 3 + 4 + 5	30 871	31 700	2,7
2 + 3 + 4	29 391	26 900	-8,5
1 + 2 + 3	22 514 (22 645)*	23 800	5,7
3 + 4 + 5	21 143	22 000	4,1
3 + 4	19 663	20 900	6,3
2 + 3	16 998	17 900	5,3
1 + 2	15 262 (15 393)*	-	-
4 + 5	13 891	13 500	-2,8
4	12 411	12 000	-3,3
2	9 746	9 400	-3,5
3	7 270	7 300	0,4
1	5 534 (5 665)*	5 700	3,0
5	1 498	-	-

*Die Molekulargewichte in Klammern beziehen sich auf die Fragmente, die noch das aminoterminale Methionin enthalten.

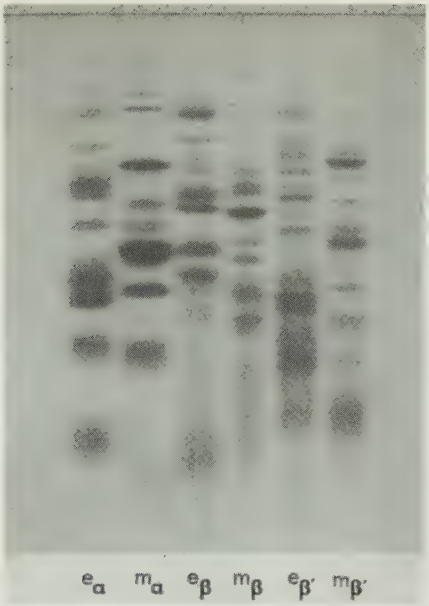


Fig. 11 Bromcyanfragmente der Untereinheiten der *E. coli* und *M. luteus* RNA-Polymerase nach Elektrophorese in einem harnstoffhaltigen Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel

Die Bromcyanspaltung wurde wie in Methoden, Kap. 8, beschrieben durchgeführt (Dauer: 21 h).
20 µg der Bromcyanfragmente jeder Untereinheit wurden 5 min bei 100°C in 10 µl Probenpuffer mit 6 M Harnstoff inkubiert und auf ein 17,5 %iges Polyacrylamid-Plattengel mit 0,1 % Natriumdodecylsulfat und 6 M Harnstoff aufgetragen (vergl. Methoden, Kap. 5). Dauer der Elektrophorese: 20 h, Spannung: 80 V, Stromstärke: 8 - 11 mA.

Die anhand von Vergleichsproteinen bestimmten Molekulargewichte der beobachteten Proteinbanden sind in Tab. 3 angegeben. Sie stimmen mit den nach der Aminosäuresequenz erwarteten Molekulargewichten innerhalb der Fehlergrenze der Methode gut überein. Abweichungen können darauf zurück-

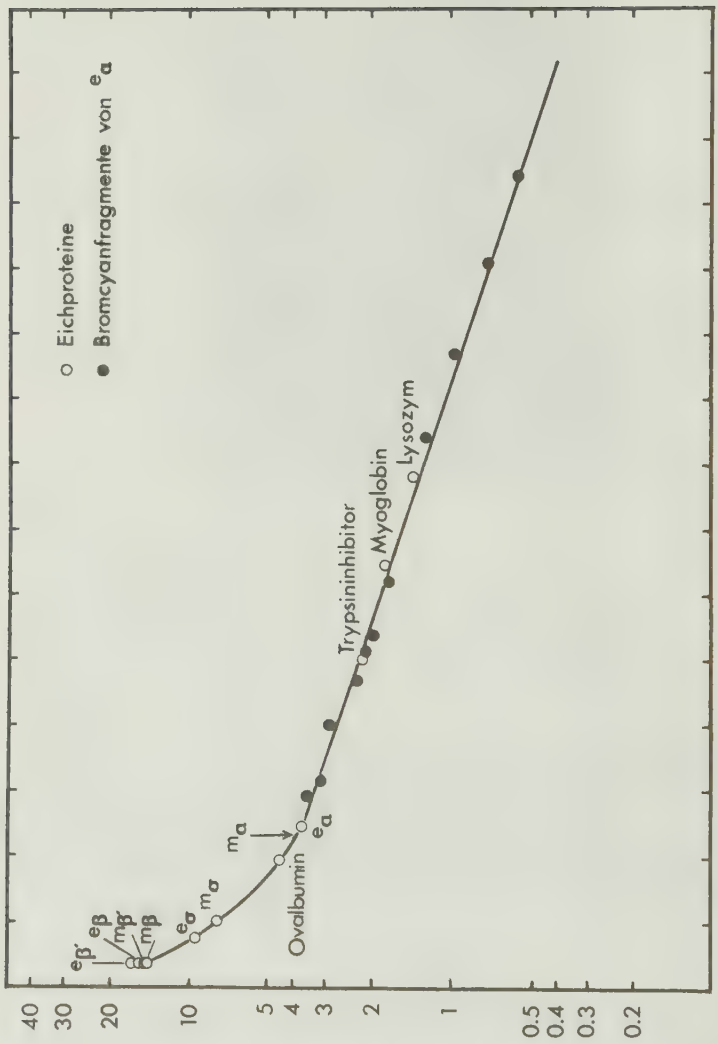

Molekulargewicht · 10⁻⁴
40
30
20
10
5
4
3
2
1
0.5
0.4
0.3
0.2
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
Abstand vom Startpunkt (cm)
○ Eichproteine
● Bromcyanfragmente von e_α
$e_{\beta'}$
e_β
$m_{\beta'}$
m_β
e_σ
m_σ
m_α
e_α
Ovalbumin
Trypsininhibitor
Myoglobin
Lysozym

Fig. 12 Eichkurve für die Molekulargewichtsbestimmung der Bromcyanfragmente durch Elektrophorese in harnstoffhaltigen Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelen

20 µg der Bromcyanfragmente von $^{e}\alpha$ und ein Gemisch aus je 0,5 µg Ovalbumin (MG 45 000), Trypsininhibitor aus Sojabohne (MG 21 500), Myoglobin vom Pferd (MG 17 800), Lysozym aus Hühnereiweiß (MG 14 000), je 1 µg RNA-Polymerase aus E. coli (β', MG 165 000; β, MG 155 000; σ, MG 95 000; α, MG 36 512) und M. luteus (β', MG 151 000; β, MG 146 000; σ, MG 80 000) wurden mit harnstoffhaltigem Probenpuffer inkubiert und einer Elektrophorese in einem harnstoffhaltigen Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel unterworfen (vergl. Legende zu Fig. 11).

Für den linearen Bereich der Kurve wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt.
Regressionsgerade: $y(x) = -0{,}0401\ x + 4{,}751$
mit: y = log Molekulargewicht
x = Abstand vom Startpunkt (cm)
Korrelationskoeffizient: $r_2 = -0{,}996$
Bestimmtheitsmaß: $r^2 = 0{,}992$

geführt werden, daß bei sehr kleinen Proteinen die Eigenladung auf die Beweglichkeit in dodecylsulfathaltigen Gelen Einfluß nimmt (Swank und Munkres, 1971).
Wegen der guten Korrelation zwischen Molekulargewicht und elektrophoretischer Beweglichkeit wurden die Bromcyanfragmente der E. coli α-Untereinheit als zusätzliche Vergleichsproteine zu den nachfolgenden Molekulargewichtsbestimmungen von $^{m}\alpha$ und den Bromcyanfragmenten der anderen Untereinheiten herangezogen (Fig. 12).

Untereinheit $^{m}\alpha$

Die α-Untereinheit der RNA-Polymerase aus M. luteus ergibt nach Spaltung durch Bromcyan 12 Banden im Polyacrylamidgel (Fig. 11). Die Molekulargewichte der Peptide sind in Fig. 13 angegeben. Sie wurden der Eichkurve von Fig. 12 entnommen. Aus der Größe der Fragmente läßt sich durch die Überlappung der unvollständig gespaltenen Peptide die

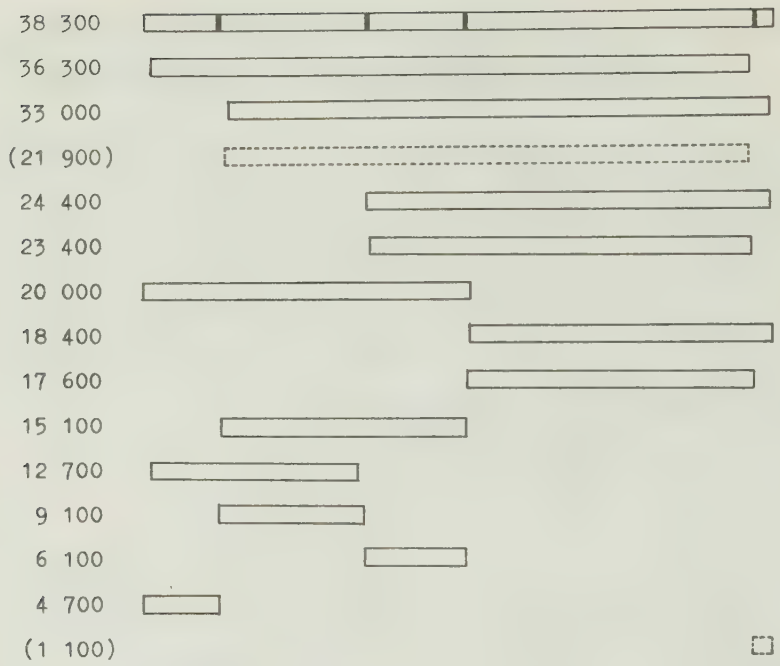


Fig. 13 Bromcyanfragmente der Untereinheit $^{m}\alpha$

Die Fragmente, deren Umrißlinien nicht ausgezogen sind, konnten im Polyacrylamidgel nicht nachgewiesen werden. Ihre Molekulargewichte wurden durch Differenzbildung berechnet. Auflösungsvermögen: ca. 8 - 10 Aminosäuren.

Position der Methioninreste im Molekül festlegen (Fig. 13). Es zeigt sich, daß die Untereinheit $^{m}\alpha$ ebenfalls aus fünf Bromcyanfragmenten* mit den Molekulargewichten 17 600,

*Die Zahl der Schnittstellen im Molekül kann nicht kleiner sein, da sich sonst die Zahl der gefundenen Peptide nicht erklären ließe; sie kann aber auch nicht größer sein, da bereits eine einzige Schnittstelle mehr die Zahl der möglichen Bruchstücke um sechs erhöhen würde.

9 100, 6 100, 4 700 und 1 100 zusammengesetzt sein muß, wobei das kleinste Peptid jedoch nur indirekt nachgewiesen werden kann. Da die Richtung des Moleküls nicht bestimmt ist, gibt es in Bezug auf die α-Untereinheit von E. coli zwei Möglichkeiten, die Methioninreste anzuordnen (Fig. 14). Dabei fällt auf, daß die Variante $^{m}\alpha(2)$ eine verhältnismäßig große Ähnlichkeit in der Methioninverteilung mit $^{e}\alpha$ aufweist. Jedoch sind die Abstände zwischen den einzelnen Methioninresten unterschiedlich groß, so daß Methionin nie an identischen Positionen in der Sequenz erscheint.

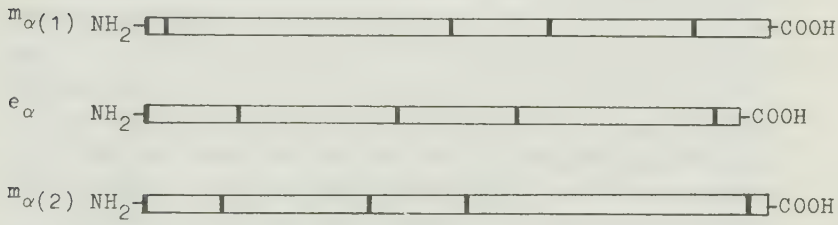


Fig. 14 Verteilung der Methioninreste in der Sequenz von $^{e}\alpha$ und $^{m}\alpha$

Die N-terminale Aminosäure der Untereinheit $^{m}\alpha$ wurde von Herrn Dr. W. Schartau, Zoologisches Institut der Universität München, durch Dansylierung unter Anwendung einer Mikromethode nach Weiner et al. (1972) bestimmt. Es zeigte sich, daß wie im Falle der E. coli α-Untereinheit (Fujiki und Zurek, 1975) das Aminoende von einem Methioninrest gebildet wird.

Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheit α

Ovchinnikov et al. (1977) finden bei der Sequenzanalyse für die E. coli α-Untereinheit ein Molekulargewicht von 36 512. Dieser Wert liegt deutlich unter dem sonst in der Literatur angegebenen Bereich von 39 000 (Burgess, 1969a) bis 41 000 (Berg und Chamberlin, 1970). Die Schwierigkeit bei der Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten der RNA-Polymerase in dodecylsulfathaltigen Polyacrylamidgelen besteht darin, daß es nicht möglich ist, das Molekulargewicht der großen Untereinheiten β und β' und der kleinen Untereinheit α gleichzeitig in einem Gelsystem mit gleicher Genauigkeit zu bestimmen. Für die Molekulargewichtsbestimmung der α-Untereinheit verwendeten wir daher ein hochprozentiges, stark vernetztes Polyacrylamidgel (Krauss und Milman, 1977), in dem zwar β und β' nicht mehr aufgelöst werden, das jedoch für kleinere Molekulargewichte besonders gut geeignet ist. Wir fanden damit für $^{e}\alpha$ ein Molekulargewicht von 36 300, welches dem von Ovchinnikov et al. berechneten Wert von 36 512 sehr nahe kommt.

Für die α-Untereinheit aus M. luteus konnte mit dieser Methode ein Molekulargewicht von 38 300 statt 44 000 (Lill, Behrendt und Hartmann, 1975) bestimmt werden (Fig. 12). Durch Addition der Molekulargewichte der Bromcyanpeptide in den in Fig. 13 dargestellten Kombinationen läßt sich ebenfalls ein Molekulargewicht für $^{m}\alpha$ berechnen. Es liegt im Durchschnitt bei 38 000 und stimmt damit gut mit dem direkt gefundenen Wert überein.

$^{e}\alpha$ und $^{m}\alpha$ unterscheiden sich danach im Molekulargewicht nur um etwa 1 500 bis 2 000. Unter der Annahme, daß die Aminosäurezusammensetzung der beiden Proteine ähnlich ist, entspricht diese Differenz 14 bis 18 Aminosäuren.

Vergleich der Bromcyanfragmente von $^{e}\beta$ und $^{e}\beta'$ mit $^{m}\beta$ und $^{m}\beta'$

Von den zur Charakterisierung der β-Untereinheiten angewendeten Verfahren ist der tryptische Abbau für die großen Untereinheiten β und β' nicht geeignet, da nach dem Arginin- und Lysingehalt der E. coli Untereinheiten (Burgess, 1969b; Fujiki und Zurek, 1975) bis zu 200 Spaltstücke zu erwarten sind. Eine gute Auflösung in einem zweidimensionalen Fingerprint ist in diesem Fall nicht mehr zu erwarten.
Andererseits geht aus Untersuchungen von Burgess et al. (1976) hervor, daß die Untereinheit $^{e}\beta$ nur 36 und $^{e}\beta'$ nur 38 Methioninreste enthält. Die methioninspezifische Spaltung mit Bromcyan erschien uns daher für einen Vergleich geeignet. Es läßt sich zwar auch in diesem Fall die große Zahl der Fragmente im Polyacrylamidgel nicht vollständig auftrennen, man erhält jedoch für jede Untereinheit ein charakteristisches Bandenmuster aus 16 bis 20 deutlich erkennbaren Proteinzonen (Fig. 11). Dieses Muster ist bei den β- und β'-Untereinheiten von E. coli und M. luteus völlig verschieden. Es treten keine Spaltstücke mit identischem Molekulargewicht auf (Tab. 4). Die Methioninreste müssen also an unterschiedlichen Positionen in der Aminosäuresequenz der Untereinheiten $^{e}\beta$, $^{e}\beta'$ und $^{m}\beta$, $^{m}\beta'$ angeordnet sein.
Die Unterschiede im Bandenmuster von $^{m}\beta$ und $^{m}\beta'$ weisen darauf hin, daß wie im Falle der E. coli RNA-Polymerase (Schachner und Zillig, 1971) ausgeschlossen werden kann, daß die kleinere β-Untereinheit durch Verlust eines Peptidstückes aus der größeren β'-Untereinheit entstanden ist.

Tab. 4 Bromcyanfragmente der Untereinheiten e_β, m_β, $e_{\beta'}$ und $m_{\beta'}$

e_β	m_β	$e_{\beta'}$	$m_{\beta'}$
35 500	37 500	43 000	40 000
33 600	35 400	36 300	30 100
31 800	32 500	34 200	27 300
27 900	31 100	32 500	26 300
25 100	29 300	31 200	24 900
23 900	26 800	27 700	22 600
20 900	25 700	26 000	20 400
19 500	23 900	24 100	19 000
15 600	22 400	22 200	17 500
13 500	21 600	21 000	16 200
12 600	19 100	19 500	14 100
11 100	16 900	17 800	12 900
8 200	15 300	16 400	10 500
6 300	12 600	13 600	8 500
5 200	10 700	12 600	6 400
3 500	8 300	12 000	4 600
	6 500	10 600	3 700
	5 500	9 500	
	4 100	6 700	
	2 300	4 300	

Die Molekulargewichte wurden der Eichkurve von Fig. 12 entnommen.

II. Immunologische Verwandtschaft der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase

Peptidchemische Untersuchungen erfassen ausschließlich die Primärstruktur eines Proteins. Es ist aber bekannt, daß sich Polypeptidketten mit unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung und -sequenz zu ähnlichen Raumstrukturen falten können (Rossmann und Argos, 1977). So findet man nahezu übereinstimmende Raumstrukturen bei Proteinen wie Insekten-Hämoglobin und Myoglobin vom Wal (Huber et al.,1969), Hühnereiweiß-Lysozym und Phagen-Lysozym (Rossmann und Argos, 1976) oder bei den beiden Domänen der Rinderleber-Rhodanese (Ploegman et al., 1978a,b), obwohl die Aminosäuresequenz völlig verschieden ist.
Eine Möglichkeit, nicht nur Homologien in der Primärstruktur (Champion et al., 1975), sondern auch in der Faltung eines Proteins festzustellen, bieten immunchemische Methoden. Es hat sich gezeigt, daß die dreidimensionale Gestalt der Proteine bei der Erkennung der antigenen Determinante durch den Antikörper eine wichtige Rolle spielt (Sela et al., 1967; Arnheim, 1973; Arnon, 1974; Teale und Benjamin, 1977; Zusammenfassung vergl. Lazdunski 1976). Besonders bei globulären Proteinen hängt die Antigenität stark von der Konformation des Moleküls ab (Arnon, 1973). So können Antigene, deren Tertiärstruktur z.B. durch Reduktion der Disulfidbrücken und anschließende Carboxymethylierung verändert wurde, nicht mehr mit den gegen das native Protein gerichteten Antikörpern reagieren (Shapira und Arnon, 1969; Arnon und Sela, 1969; Maron et al., 1971). Andererseits kann aber auch durch den Einfluß spezifischer Antikörper die Konformation eines reversibel denaturierten Enzyms oder einer inaktiven Mutante so wiederhergestellt werden, daß das Enzym seine Aktivität zurückgewinnt (Rotmann und Celada, 1968; Feinstein et al., 1971).

In den folgenden Versuchen soll die Verwandtschaft der RNA-Polymerase aus E. coli und M. luteus mit Hilfe der mit diesen Antigenen erzeugten Antikörpern nach verschiedenen Gesichtspunkten untersucht werden:

1. Können die RNA-Polymerasen und ihre Untereinheiten mit dem jeweiligen heterologen Antiserum Immunpräzipitate ausbilden?
2. Findet eine Kreuzreaktion statt, die zur Bildung löslicher Antigen-Antikörper-Komplexe führt?
3. Gibt es quantitative Unterschiede in der Kreuzreaktion der RNA-Polymerase und ihrer Untereinheiten?
4. Welchen Einfluß hat der heterologe Antikörper auf die Enzymaktivität?

1. Vergleich durch Immundiffusion

Core- und Holoenzyme

Immunologisch kreuzreagierendes Material kann durch Präzipitatbildung im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (1962) nachgewiesen werden. Läßt man Antikörper gegen E. coli RNA-Polymerase im Agarosegel gegen E. coli und M. luteus Holoenzym diffundieren, so findet man nach 24 Stunden eine scharfe Präzipitationslinie nur mit dem homologen Antigen (Fig. 15a). Dieses Ergebnis verändert sich nicht, wenn man die Inkubationszeit auf zwei bis drei Tage ausdehnt (Fig. 16a). Weder das Holo- noch das Coreenzym von M. luteus kann mit dem Anti-^{e}holo-Serum präzipitieren.
Anders sieht der Versuch im Falle des Anti-^{m}holo-Serums aus: Nach 24-stündiger Inkubation findet man zwar zunächst ebenfalls keine Reaktion zwischen der E. coli RNA-Polymerase und dem heterologen Antiserum (Fig. 15b); bei längeren Inkubationszeiten wird jedoch nach dem Anfärben der Präzipitate eine sehr schwache, diffuse Bande zwischen E. coli Holo- und Coreenzym und dem Anti-^{m}holo-Serum sichtbar (Fig. 16b). Dieser Befund deutet auf eine sehr schwache Kreuzreaktion der E. coli RNA-Polymerase mit Anti-^{m}holo-Antiserum hin.
M. luteus Holoenzym bildet mit dem homologen Antiserum neben der Hauptpräzipitationslinie noch eine zweite, diffuse Bande aus, die sich manchmal noch weiter aufzuspalten scheint (Fig. 15b und Fig. 16b). Diese Inhomogenität wird bei allen untersuchten Holoenzympräparationen beobachtet, jedoch nicht bei M. luteus Coreenzym (Fig. 16b). Die Möglichkeit, daß es sich dabei um Proteinverunreinigungen in den Enzympräparationen handelt, kann nicht ganz ausgeschlossen werden, da bei einigen Präparationen im Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel zwei zusätzliche Protein-

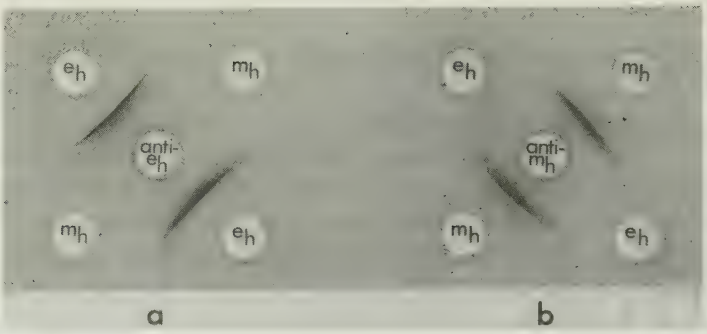


Fig. 15 Doppeldiffusionstest der Holoenzyme nach 24-stündiger Inkubation

a) Reaktion mit Anti-^{e}holo-Serum
b) Reaktion mit Anti-^{m}holo-Serum

Diffusionsgel: 0,7 % Agarose in 0,03 M Veronalpuffer pH 8,6. Die äußeren Löcher enthielten jeweils 20 µg RNA-Polymerase in 1 - 5 µl Puffer A (Burgess, 1969a) mit 0,1 M KCl und 60 % Glycerin, das mittlere Loch jeweils 10 µl ungereinigtes Antiserum. Die Präzipitate wurden wie in Methoden, Kap. 10 beschrieben angefärbt.

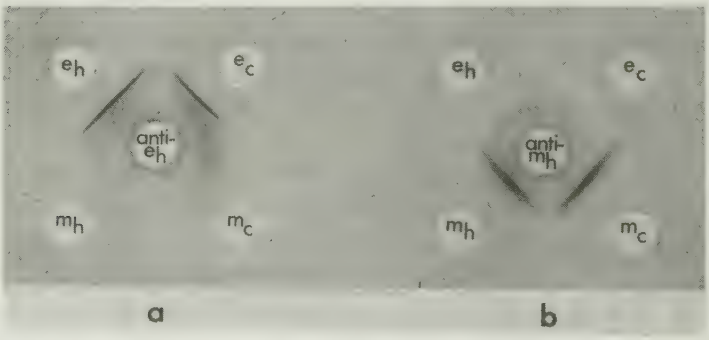


Fig. 16 Doppeldiffusionstest der Core- und Holoenzyme nach 48-stündiger Inkubation

a) Reaktion mit Anti-^{e}holo-Serum
b) Reaktion mit Anti-^{m}holo-Serum

Durchführung vergl. Legende zu Fig. 15.

banden mit einem Molekulargewicht von 25 000 und 14 000 entdeckt werden können (vergl. Fig. 1), die jedoch höchstens 5 % des Gesamtproteins ausmachen (Lill et al., 1977). Andererseits mag jedoch der Grund für die Aufspaltung darin liegen, daß die Holoenzympräparationen von M. luteus RNA-Polymerase nicht σ-gesättigt sind, sondern nur zwischen 50 und 80 % der stöchiometrischen Menge an σ-Faktor enthalten, so daß eigentlich ein Gemisch aus Holo- und Coreenzym vorliegt. Außerdem neigt M. luteus Holoenzym dazu, bei niederer Ionenstärke zu einem Dimeren zu aggregieren (Lill et al., 1977). Da der Salzgehalt der Enzymlösung im Verlaufe der Diffusion in das Agarosegel langsam verdünnt wird, ist es denkbar, daß zu verschiedenen Zeitpunkten monomeres und dimeres Holoenzym im Gel vorliegen und mit dem Antiserum reagieren können. In einem einheitlichen System können in der Immundiffusion auch bei unterschiedlichen Molekulargewichten des Antigens mehrere Banden auftreten (Kabat, 1961).

Dissoziierte RNA-Polymerase

Zu den folgenden Versuchen wurde die RNA-Polymerase durch Elektrophorese in dodecylsulfathaltigen Polyacrylamidgelen in ihre Untereinheiten aufgespalten. Trotz der Anwesenheit von Dodecylsulfat können Proteine direkt im Polyacrylamidgel durch Reaktion mit Antiserum in Form von Immunpräzipitaten sichtbar gemacht werden (Stumph, Elgin und Hood, 1974; Olden und Yamada, 1977).
Alle Untereinheiten der RNA-Polymerase aus E. coli und M. luteus bilden, nach Inkubation der Gele mit Antiserum, deutliche Präzipitationsbanden mit dem jeweiligen homologen Antikörper aus. Fig. 17 zeigt die densitometrische Aufzeichnung der ungefärbten Präzipitatbanden. Man findet jedoch keine Präzipitatbildung mit dem heterologen Antiserum.

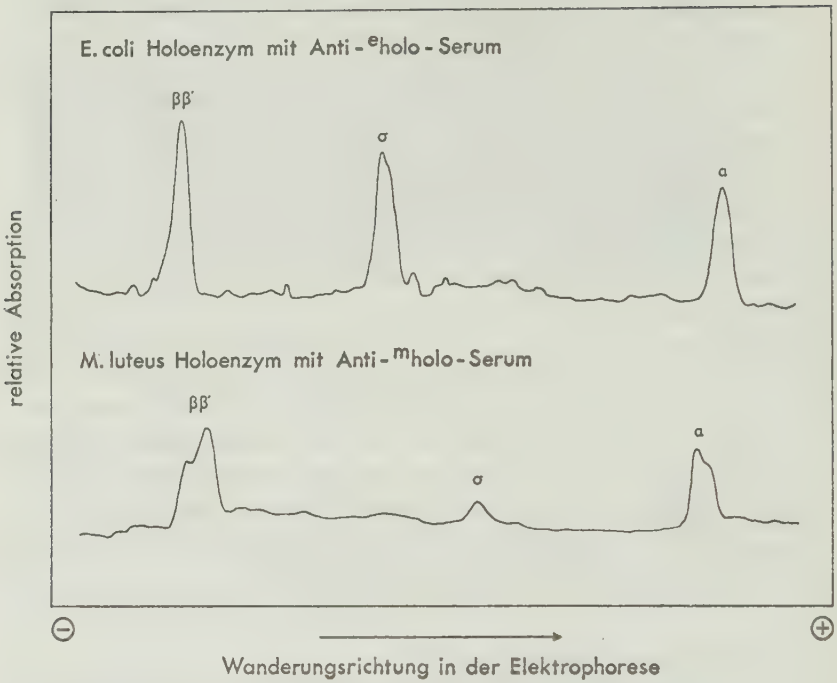


Fig. 17 Immunpräzipitate der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase nach Elektrophorese im Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel

Jeweils 5 µg RNA-Polymerase wurden in 10 µl Probenpuffer (Laemmli, 1970) 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend einer Elektrophorese in einem dodecylsulfathaltigen Polyacrylamid-Plattengel unterworfen (vergl. Methoden, Kap. 5). Trenngel: linearer Gradient von 5 - 15 % Acrylamid, Dauer der Elektrophorese: 16 h, Spannung: 60 V, Stromstärke: 10 - 12 mA.
Inkubation mit Antiserum vergl. Methoden, Kap. 11.
Die Gele wurden mit einem Joyce-Loebl Mikrodensitometer 3 CS aufgezeichnet. Filter 550 nm, Graufilter 1-5D, Graukeil 0,38D, Spaltbreite: 50 Skalenteile, Spalthöhe: 8 Skalenteile.

Um eine möglicherweise schwache Kreuzreaktion zu verstärken, wurden die Gele anschließend noch mit fluoreszenzmarkiertem Antiserum aus Ziege gegen Kaninchen-Immunglobulin behandelt (Stumph et al., 1974). Dieser sehr empfindliche Nachweis führt zu einer deutlichen Verbesserung der Sichtbarkeit von Präzipitationsbanden in Gelen, die vorher mit dem homologen Antiserum inkubiert wurden. Es läßt sich damit jedoch keine Reaktion zwischen den Untereinheiten der E. coli RNA-Polymerase und Anti-^{m}holo-Serum bzw. zwischen den Untereinheiten der M. luteus RNA-Polymerase und Anti-^{e}holo-Serum nachweisen (Fig. 18).

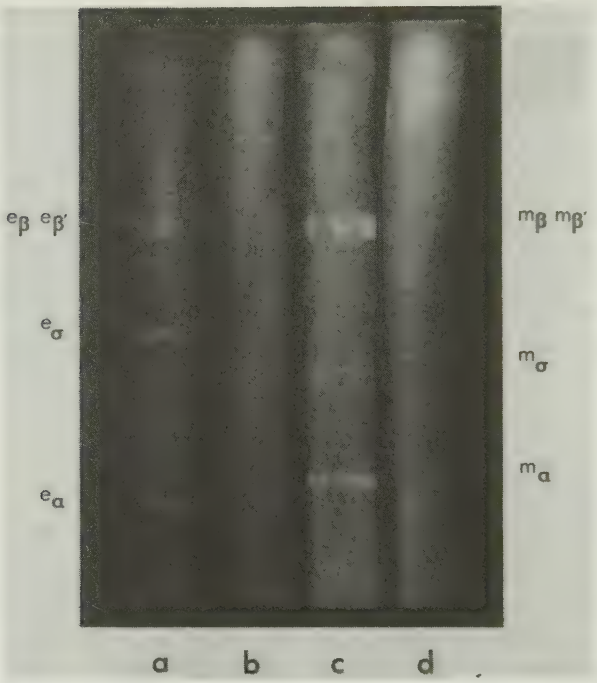


Fig. 18 Immunpräzipitate der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase in dodecylsulfathaltigen Polyacrylamidgelen nach Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Antiserum

a) Anti-^{e}holo-Serum gegen E. coli Holoenzym
b) Anti-^{m}holo-Serum gegen E. coli Holoenzym
c) Anti-^{m}holo-Serum gegen M. luteus Holoenzym
d) Anti-^{e}holo-Serum gegen M. luteus Holoenzym

Die Elektrophorese erfolgte wie in der Legende zu Fig. 17 beschrieben. Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Aniserum vergl. Methoden, Kap. 11.

2. Vergleich durch Mikrokomplementfixierung

Die im vorangehenden Kapitel beschriebenen immunologischen Untersuchungsmethoden befassen sich ausschließlich mit Antigen-Antikörper-Reaktionen, die zu einer Präzipitatbildung führen. Unter Umständen kann jedoch, z. B. wenn die Zahl der antigenen Determinanten auf dem Molekül zu klein ist, eine Vernetzung der Antigen-Antikörper-Komplexe ausbleiben. Eine sehr empfindliche Methode, die auch lösliche Antigen-Antikörper-Komplexe erfaßt, ist der Mikrokomplementbindungstest, der von Wassermann und Levine (1961) entwickelt wurde. Dabei erfolgt der Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion indirekt: Aufgrund eines allosterischen Effekts im FC-Bereich können Antikörper nach Reaktion mit dem Antigen die erste Komponente des Komplementsystems, den C_1-Faktor, binden und damit das Komplementsystem aktivieren. Um die Komplementaktivierung auszulösen, genügt theoretisch schon ein Komplex aus drei Antigen- und zwei Immunglobulin G-Molekülen (Campbell et al., 1970). In einem Testsystem mit bekannter Ausgangsmenge an Komplement nimmt das freie Komplement in Abhängigkeit von der vorhandenen Menge an Antigen-Antikörper-Komplex ab. Die Abnahme kann anschließend durch Zugabe eines Indikatorsystems bestimmt werden. Dabei wird das vom Testsystem nicht fixierte Komplement gemessen. Als Indikatorsystem werden Schaferythrozyten verwendet, die vorher mit Anti-Erythrozyten-Serum (Hämolysin, Amboceptor) sensibilisiert wurden und daher in Anwesenheit von Komplement hämolysiert werden. Der Hämolysegrad, der der Menge an fixiertem Komplement umgekehrt proportional ist, kann photometrisch bestimmt werden. Diese Methode ist so empfindlich, daß Antigene noch im Nanogramm-Bereich erfaßt werden können (Übersicht: Haas und Zwilling, 1976).

Ein weiterer Vorzug der Mikrokomplementfixierung ist, daß sie eine quantitative Auswertung der Kreuzreaktion verschiedener Proteine und damit ihre phylogenetische Zuordnung gestattet (Champion et al., 1974, 1975). Dabei ist die Menge des durch die Antigen-Antikörperreaktion gebundenen Komplements ein direktes Maß für die Zahl der antigenen Determinanten, die durch das Antiserum erkannt werden. Der Grad der Verwandtschaft zwischen heterologem und homologem Antigen wird durch die "Immunologische Distanz" ausgedrückt. Sie ist definiert als 100 x log Index of Dissimilarity (Champion et al., 1974). Mit "Index of Dissimilarity" bezeichnet man den Faktor, um welchen die Antiserumkonzentration erhöht werden muß, um mit dem heterologen Antigen eine Komplementbindungskurve zu erhalten, die der des homologen Antigens entspricht (Wilson et al., 1964). Durch die Einführung der Immunologischen Distanz als Maß für die Kreuzreaktion zweier Antigene können auch wenig verwandte Proteine quantitativ untersucht werden (Sarich und Wilson, 1966).

Core- und Holoenzyme

Untersuchung mit Anti-^{m}holo-Serum

In Fig. 19 sind die Komplementbindungskurven des Core- und des Holoenzyms aus E. coli und M. luteus mit Anti-^{m}holo-Serum dargestellt. Vergleicht man zunächst die beiden homologen Antigene miteinander, so findet man bei gleicher Antigenkonzentration eine deutlich geringere maximale Komplementfixierung durch das M. luteus Coreenzym als durch das Holoenzym.
Levine und Van Vunakis (1967) haben gezeigt, daß eine Erniedrigung der Mikrokomplementfixierungskurve ohne gleichzeitige Verschiebung des Maximums zu höheren Anti-

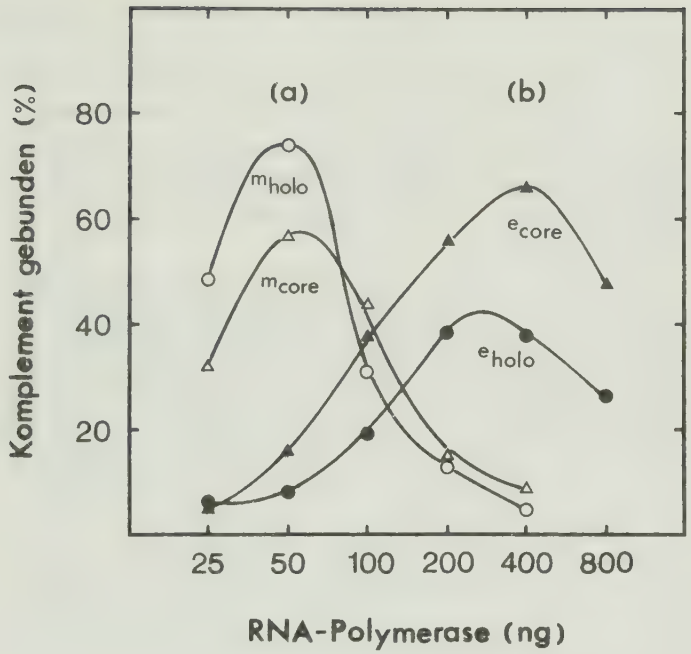


Fig. 19 Komplementfixierungskurven der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase mit Anti-^{m}holo-Serum

a) Antiserumverdünnung 1 : 512
b) Antiserumverdünnung 1 : 8
Versuchsdurchführung vergl. Methoden, Kap. 12

genkonzentrationen wahrscheinlich auf den Verlust von einer oder mehreren antigenen Determinanten zurückzuführen ist, während die übrigen Determinanten noch die gleiche Affinität zu ihrem spezifischen Antikörper beibehalten haben. Nach Abspaltung der beiden C-terminalen Aminosäuren der β-Ketten von Hämoglobin A fanden sie eine Abnahme der

Komplementbindung mit einer exakt vertikalen Verschiebung des Maximums.
Diese Erklärung läßt sich auch auf unseren Fall anwenden: Zweifellos besitzt der σ-Faktor antigene Determinanten, die zur Reaktion des M. luteus Holoenzyms im Mikrokomplementbindungstest beitragen. Der Verlust dieser antigenen Determinanten führt bei M. luteus Coreenzym zu einer Abnahme der Komplementfixierung.
Umso überraschender ist jedoch, daß sich dieser Effekt im Fall der heterologen Antigene umkehrt: Das E. coli Coreenzym vemag mit Anti-^{m}holo-Serum mehr Komplement zu binden als das Holoenzym. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß die σ-Untereinheiten von E. coli und von M. luteus RNA-Polymerase weniger ähnlich sind als die beiden Coreenzyme. Man muß annehmen, daß im Holoenzym gemeinsame antigene Determinanten der Coreenzyme durch die Bindung mit dem σ-Faktor abgedeckt werden.
Die Komplementbindungsmaxima der heterologen E. coli RNA-Polymerase sind im Vergleich zu den Kurven der homologen M. luteus RNA-Polymerase zu nahezu achtmal höheren Antigenkonzentrationen verschoben.
Derartige horizontale Verschiebungen der Komplementfixierungskurven findet man auch, wenn man native und denaturierte Proteine im Komplementbindungstest miteinander vergleicht. Gerstein et al. (1964) erhielten eine zunehmende seitliche Kurvenverschiebung, wenn sie Pepsinogen vor dem Komplementbindungstest mit steigenden Mengen an Harnstoff behandelten. Ein ähnlicher Effekt wurde auch mit hitzedenaturierter Tryptophansynthetase aus E. coli beobachtet (Murphy und Mills, 1969). Es wird angenommen, daß die antigenen Determinanten durch die Denaturierung Konformationsänderungen erfahren, die zu einer Verringerung der Affinität zum Antikörper führen. Als Folge der herabgesetzten Affinität ist eine höhere Konzentration an Antigen erforderlich, um die gleiche

Menge an Komplement zu binden.
Auf unseren Fall (Fig. 19) angewendet bedeutet dies, daß die noch kreuzreagierenden antigenen Determinanten bereits eine etwas veränderte Stuktur besitzen, so daß sie nicht mehr optimal mit den entsprechenden heterologen Antikörpern zusammenpassen, was zu einer Erhöhung der Dissoziationskonstante des Antigen-Antikörper-Komplexes führt.

Die Immunologische Distanz zwischen der E. coli und der M. luteus RNA-Polymerase wurde graphisch nach der Methode von Champion, Prager und Wilson (1974) ermittelt (Fig. 20). Sie beträgt für die Coreenzyme 176 und für die Holoenzyme 194 (Tab. 5). Die Coreenzyme sind also näher miteinander verwandt als die Holoenzyme.

Tab. 5 Immunologische Distanzen zwischen E. coli und M. luteus RNA-Polymerase

	Immunologische Distanz	
	Anti-^{e}holo-Serum	Anti-^{m}holo-Serum
^{e}holo - ^{e}core	6	-
^{m}holo - ^{m}core	-	6
^{e}holo - ^{m}holo	310*	194
^{e}core - ^{m}core	290*	176

Die Immunologischen Distanzen wurden aus den Kurven von Fig. 20 und Fig. 22 graphisch bestimmt (vergl. Methoden, Kap. 12).

*geschätzte Zahlen

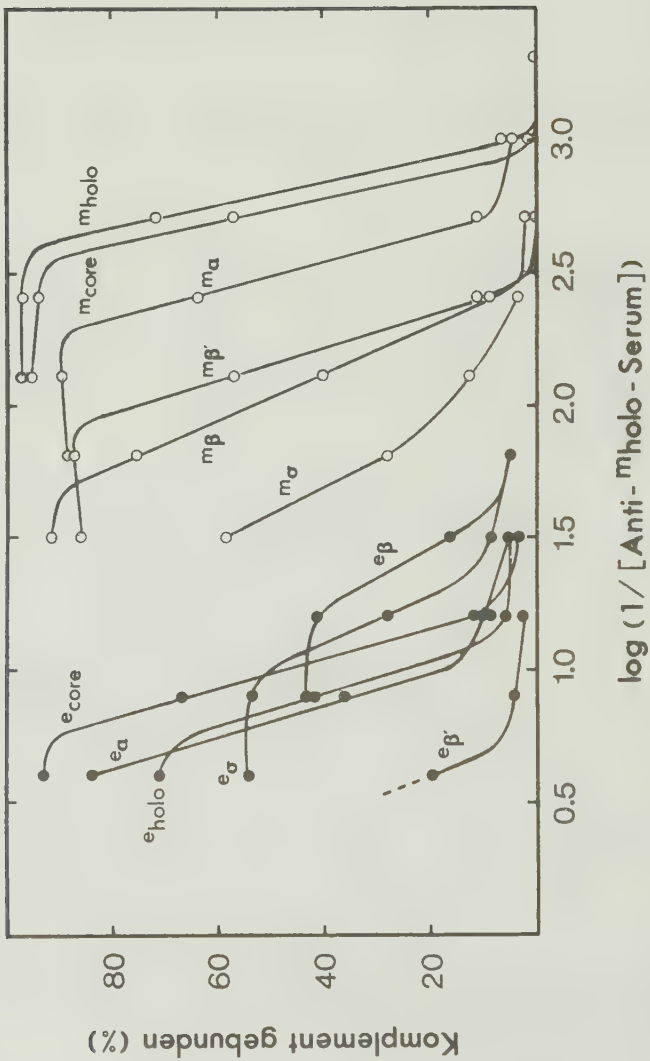

Komplement gebunden (%)
80
60
40
20
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
log (1/ [Anti-mholo-Serum])
mholo
mcore
mα
mβ'
mβ
mσ
ecore
eα
eholo
eσ
eβ
eβ'

Fig. 20 Komplementfixierung der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase und ihrer Untereinheiten mit Anti-^{m}holo-Serum in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration

Jeder Punkt entspricht dem Maximum einer Komplementbindungskurve für eine bestimmte Antiserumkonzentration (vergl. Fig. 19).

Untersuchung mit Anti-^{e}holo-Serum

Ähnliche Verhältnisse wie im Komplementbindungstest mit Anti-^{m}holo-Serum findet man, wenn man die RNA-Polymerasen aus E. coli und M. luteus mit Anti-^{e}holo-Serum untersucht. Wieder reagiert das heterologe Coreenzym besser mit dem Anti-^{e}holo-Antikörper als das heterologe Holoenzym, während sich die homologen Enzyme erwartungsgemäß verhalten (Fig. 21). Die Verschiebung der Komplementbindungsmaxima der heterologen Antigene zu höheren Antigenkonzentrationen ist noch wesentlich stärker ausgeprägt als in Fig. 19.

Die aus den Komplementbindungsmaxima bei verschiedenen Antiserumkonzentrationen erhaltenen Kurven der heterologen M. luteus Enzyme sind im Vergleich zu den Kurven der homologen E. coli Enzyme stark abgeflacht (Fig. 22). Es wird eine maximale Komplementfixierung von nur etwa 40 % erreicht. Die daraus ermittelte Immunologische Distanz beträgt für die Coreenzyme etwa 290 und für die Holoenzyme etwa 310 (Tab. 5). Damit ist wieder der Abstand der Coreenzyme etwas kleiner als der Abstand der Holoenzyme. Da die Kurven der homologen und heterologen Antigene in Fig. 22 nicht die gleiche Steigung haben, konnten die davon abgeleiteten Immunologischen Distanzen nur geschätzt werden. Eindeutig ist jedoch die Zuordnung einer besseren oder schlechteren Kreuzreaktion nach der Reihenfolge der

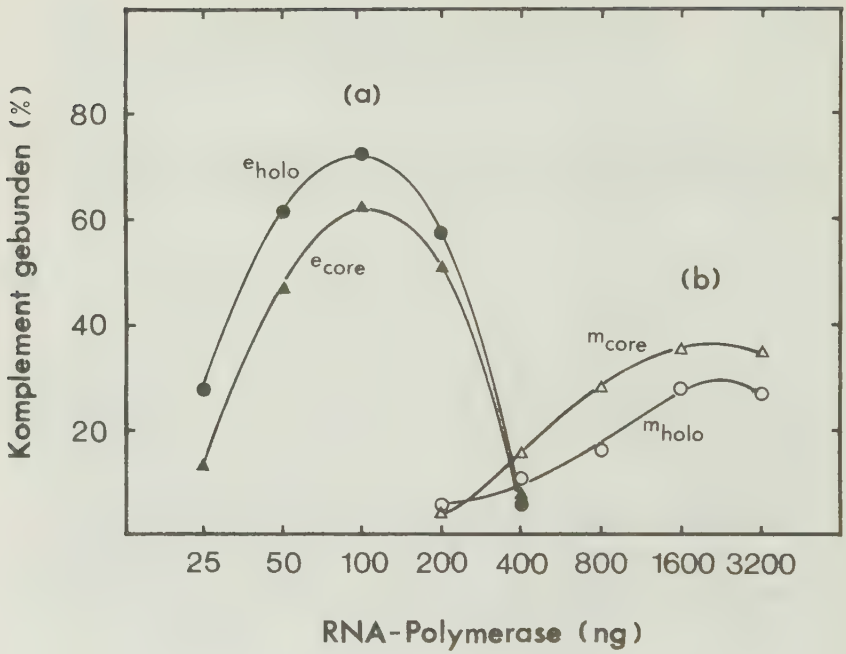


Fig. 21 Komplementfixierungskurven der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase mit Anti-^{e}holo-Serum

a) Antiserumverdünnung 1 : 4 096
b) Antiserumverdünnung 1 : 4
Versuchsdurchführung vergl. Methoden, Kap. 12

Kurven mit steigender Antiserumkonzentration. Die mit Anti-^{e}holo Serum durchgeführten Versuche erreichen die Grenze der Nachweisbarkeit einer immunologischen Kreuzreaktion. Bei Versuchen mit einem weiteren Antiserum gegen E. coli RNA-Polymerase konnte, wohl auch infolge des niedrigen Antiserumtiters (vergl. Tab. 1), keinerlei

Kreuzreaktion mehr mit M. luteus RNA-Polymerase festgestellt werden (ohne Beleg).

Zusammenhang zwischen Immunologischer Distanz und Primärstruktur

Champion et al. (1974, 1975) finden eine lineare Beziehung zwischen Immunologischer Distanz und Aminosäuresequenz, die sich durch die Gleichung

Immunologische Distanz ≈ 5 x Sequenzdifferenz (%)

beschreiben läßt. Diese Bedingung wird von verschiedenen Proteinen, wie der α-Untereinheit bakterieller Tryptophansynthetasen (Murphy und Mills, 1969; Champion et al., 1975), bakteriellen Azurinen (Champion et al., 1975), Vogellysozymen (Prager und Wilson, 1971a; Wilson und Prager, 1974) und pankreatischen Ribonukleasen (Welling et al., 1976) annähernd erfüllt.
Eine Immunologische Distanz von 100 entspricht danach einem Aminosäureaustausch von etwa 20 %. Bei einer Immunologischen Distanz über 200 (≙ ca. 40 % Sequenzunterschied) können bereits keine Immunpräzipitate mehr nachgewiesen werden (Prager und Wilson, 1971b), und eine lineare Zuordnung zur Struktur ist nicht mehr möglich (Champion et al., 1974).
Aus diesen Angaben lassen sich jedoch nicht ohne weiteres quantitative Aussagen über die Primärstruktur der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase ableiten, da die RNA-Polymerase 10 bis 30 mal so groß ist wie die oben genannten Proteine und somit weite Teile der Aminosäuresequenz im Inneren des Moleküls liegen und einer Immunreaktion nicht zugänglich sind. Außerdem wird bei dieser Betrachtungsweise der Einfluß der Konformation des Moleküls auf seine Antigenität nicht berücksichtigt. Immerhin läßt sich aus

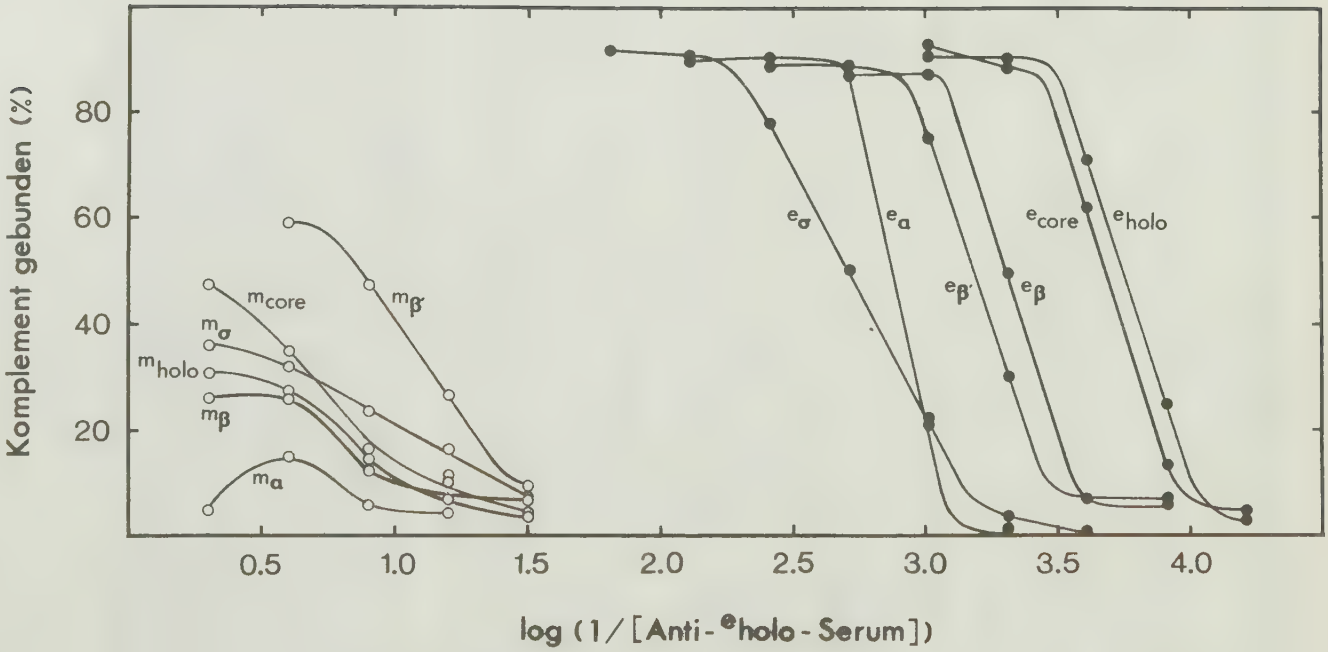

Komplement gebunden (%)
80
60
40
20
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
log (1/[Anti-⊕holo-Serum])
mcore
mσ
mholo
mβ
mα
mβ'
eσ
eα
eβ'
eβ
ecore
eholo

Fig. 22 Komplementfixierung der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase und ihrer Untereinheiten mit Anti-^{e}holo-Serum in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration

Jeder Punkt entspricht dem Maximum einer Komplementbindungskurve für eine bestimmte Antiserumkonzentration (vergl. Fig. 21).

diesen Beispielen ersehen, daß die für E. coli und M. luteus RNA-Polymerase gefundenen Immunologischen Distanzen für eine äußerst geringe Verwandtschaft der Enzyme sprechen.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch die außerordentlich kleine Immunologische Distanz zwischen den jeweiligen homologen Core- und Holoenzymen. Sowohl bei der E. coli als auch bei der M. luteus RNA-Polymerase führt der Verlust einer ganzen Untereinheit, nämlich des σ-Faktors, zu einer Immunologischen Distanz von nur 6 Einheiten (Tab. 5). Wilson et al. (1964) fanden im Vergleich dazu bei Hämoglobinmutanten, die sich nur durch eine einzige Aminosäuresubstitution unterscheiden, bereits eine Immunologische Distanz von 11 und bei Hämoglobinen mit sieben bis acht ausgetauschten Aminosäuren eine Immunologische Distanz von 30. Es ist unwahrscheinlich, daß der σ-Faktor nur eine oder sehr wenige antigene Determinanten hat, da er ja mit dem Antiserum gegen das Holoenzym zu präzipitieren vermag (vergl. Fig. 17 und Fig. 18). Wahrscheinlicher ist, daß im Coreenzym der Verlust der Untereinheit σ weitgehend dadurch ausgeglichen wird, daß anstelle der σ-spezifischen antigenen Determinanten Coreenzym-spezifische Determinanten treten, die im Holoenzym durch den σ-Faktor verdeckt bleiben (vergl. auch S. 68). Da praktisch alle Holoenzympräparationen der E. coli und

M. luteus RNA-Polymerase auch Anteile an Coreenzym enthalten, finden sich in den damit hergestellten Antiseren zweifellos auch Antikörper, die für das Coreenzym spezifisch sind.

Isolierte Untereinheiten

Spezifität der Antiseren

Um die immunologischen Eigenschaften der Untereinheiten der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase im Komplementbindungstest zu untersuchen, boten sich uns die beiden alternativen Möglichkeiten an, entweder ein einziges Antiserum zu verwenden, das Antikörper gegen alle Untereinheiten enthält, und das durch gleichzeitige Immunisierung mit allen Untereinheiten gewonnen wurde, oder gegen jede Untereinheit ein eigenes Antiserum herzustellen.
Gegen die zweite Vorgehensweise spricht, daß die Spezifität der Antikörper in verschiedenen Antiseren stark variieren kann. Je spezifischer ein Antiserum ist, desto größer sind die aus dem Komplementbindungstest resultierenden Immunologischen Distanzen (Prager und Wilson, 1971a). Im Idealfall sollten reziproke Tests jeweils die gleiche Immunologische Distanz für zwei verwandte Proteine liefern. In der Praxis findet man jedoch häufig Abweichungen (Champion et al., 1974, 1975).
In unserem Fall unterscheiden sich die Immunologischen Distanzen, die für die Core- und Holoenzyme mit Anti-^{m}holo-Serum gemessen wurden, in ihrer Größenordnung deutlich von den mit Anti-^{e}holo-Antiserum bestimmten Immunologischen Distanzen (vergl. Tab. 5). Berechnet man aus den in Tab. 5 angegebenen Werten die Abweichungen von der mittleren Immunologischen Distanz nach der von Cham-

pion et al. (1974) angegebenen Formel*, so findet man für die Coreenzyme 25 % und für die Holoenzyme 23 % Abweichung vom Durchschnitt.

Eine Ursache für die verschiedenen Antiserumspezifitäten können die individuellen Eigenarten der zur Imunisierung verwendeten Kaninchen sein. Prager und Wilson (1971a) empfehlen daher, möglichst viele Kaninchen zu immunisieren und die gewonnenen Antiseren umgekehrt proportional zu ihrem Titer zu mischen, um von jedem Tier die gleiche Menge an komplementbindenden Antikörpern zu erhalten.

Außerdem ist die Antiserumspezifität auch von der Immunisierungsdauer abhängig. Prager und Wilson (1971a) und Cocks und Wilson (1972) fanden, daß die Spezifität der Antikörper, gemessen an der Immunologischen Distanz der untersuchten Antigene, zu Beginn der Immunisierung am größten ist und innerhalb von etwa drei Monaten auf einen konstanten Wert abfällt. Die Autoren empfehlen daher, über längere Zeiträume zu immunisieren. Nachteilig ist jedoch, daß derartig lange Immunisierungszeiten oft mit einem beträchtlichen Abfall des Antikörpertiters verbunden sind (Prager und Wilson, 1971a).

Doch auch wenn die oben genannten Bedingungen eingehalten werden, können noch beachtliche Spezifitätsschwankungen bei reziproken Komplementbindungstests auftreten. So finden Champion et al (1975) auch bei Immunisierungsperioden

---

*Abweichung von der durchschnittlichen Immunologischen Distanz in %:

$$\frac{A - B}{A + B} \times 100$$

Dabei ist A die Immunologische Distanz zwischen den Proteinen P und Q gemessen mit Antiserum gegen P, und B die Immunologische Distanz zwischen den Proteinen P und Q gemessen mit Antiserum gegen Q.

von fünf bis sechs Monaten und Verwendung gepoolter Antiseren aus drei bis vier Kaninchen noch Abweichungen bis zu 30 % von der durchschnittlichen Immunologischen Distanz.

Diese Abweichungen sind jedoch nur dann relevant, wenn man Vergleiche zwischen Immunologischen Distanzen anstellen will, die mit verschiedenen Antiseren gemessen wurden. Für uns folgt daraus, daß die Entscheidung, ob die eine oder die andere Untereinheit der E. coli RNA-Polymerase mit der entsprechenden Untereinheit der M. luteus RNA-Polymerase näher verwandt ist, nicht getroffen werden kann, wenn der Test mit verschiedenen Antiseren durchgeführt wird, da etwaige Abstufungen in der Antigenität der Untereinheiten in diesem Fall genausogut auf die unterschiedliche Antiserumspezifität zurückgeführt werden könnten. Wenn wir uns dagegen von vornherein darauf beschränken, die Immunologischen Distanzen in ihren Zahlenwerten nur innerhalb eines Antiserums miteinander zu vergleichen, so hat dies zusätzlich den Vorteil, daß das Problem des Immunisierungszeitraums und der Zahl der immunisierten Kaninchen für uns unerheblich wird. Zu den im folgenden Abschnitt beschriebenen Versuchen zur Verwandtschaft der Untereinheiten wurden daher die mit dem E. coli und M. luteus Holoenzym gewonnenen Antiseren verwendet.

Immunologische Distanz

Im Komplementbindungstest zeigen sämtliche Untereinheiten der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase eine bessere Kreuzreaktion als die Core- und Holoenzyme (Fig. 20 und Fig. 22, Tab. 6). Um diesen Befund zu erklären, müssen wir zunächst die Zusammensetzung der verwendeten Antiseren betrachten.
Es ist bekannt, daß die Immunisierung in Gegenwart von Freunds Adjuvans unter Umständen zu einer teilweisen

Tab. 6 Immunologische Distanzen zwischen den Untereinheiten der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase

	Immunologische Distanz	
	Anti-^{e}holo-Serum	Anti-^{m}holo-Serum
$^{e}holo - ^{m}holo$	310*	194
$^{e}core - ^{m}core$	290*	176
$^{e}\beta' - ^{m}\beta'$	220	180
$^{e}\beta - ^{m}\beta$	270*	86
$^{e}\sigma - ^{m}\sigma$	200*	61
$^{e}\alpha - ^{m}\alpha$	230*	167

Die Immunologischen Distanzen wurden aus den Kurven von Fig. 20 und Fig. 22 graphisch bestimmt (vergl. Methoden, Kap. 12)

*geschätzte Zahlen

Denaturierung der als Antigen verwendeten Proteine führen kann. Murphy und Mills (1969) haben den Einfluß von Freunds Adjuvans auf die Spezifität des damit gewonnenen Antiserums am Beispiel der α-Untereinheit der Tryptophansynthetase aus E. coli untersucht. Sie fanden, daß Antikörper, die ohne Zugabe von Freunds Adjuvans bei der Immunisierung gewonnen wurden, im Komplementfixierungstest besser mit dem nativen Protein reagieren als mit der durch Erhitzen denaturierten Tryptophansynthetase. Dagegen bindet im Test mit Antiserum, das unter Verwendung von Freunds Adjuvans hergestellt wurde, die hitzedenaturierte Tryptophansynthetase mehr Komplement als die native Tryptophansynthetase. Murphy und Mills schlossen daraus, daß bei der Immunisie-

rung mit Freunds Adjuvans auch Antikörper gegen antigene Determinanten erhalten werden, die erst bei der Denaturierung des Enzyms freigelegt werden.
Wir können davon ausgehen, daß ähnliche Vorgänge wahrscheinlich auch bei der Immunisierung mit RNA-Polymerase als Antigen stattfinden, da die RNA-Polymerase allgemein als sehr empfindlich gegenüber denaturierenden Einflüssen gilt. Wenn wir also annehmen, daß die Verwendung von Freunds Adjuvans bei der Immunisierung zu einer partiellen Denaturierung und Aufspaltung des Enzyms in seine Untereinheiten führt, so müssen wir erwarten, daß in unserem Antiserum auch Antikörper gegen die Bereiche der Untereinheiten gebildet werden, die sonst im Inneren des RNA-Polymerasemoleküls verborgen sind. Aus der Tatsache, daß die Core- und Holoenzyme mit diesen Antiseren wenig Kreuzreaktion zeigen, die einzelnen Untereinheiten aber ohne Ausnahme besser kreuzreagieren können, lassen sich zwei Aussagen ableiten:

1. Unsere Überlegungen, daß die Antiseren neben den Antikörpern gegen die Außenseite des Proteinmoleküls auch Antikörper gegen die inneren Bereiche der RNA-Polymerase enthalten können, treffen zu.
2. Die Strukturen, die freigelegt werden, wenn die RNA-Polymerase in ihre Untereinheiten dissoziiert wird, müssen enger miteinander verwandt sein als die Außenseiten des RNA-Polymerasemoleküls.

In Analogie zu diesem Befund steht die Beobachtung, daß manche Proteine nach Auffaltung durch denaturierende Agentien besser miteinander kreuzreagieren als im nativen Zustand. Beispiele dafür sind menschliches Lysozym und Lysozym aus Hühnereiweiß (Arnheim et al., 1971), Kaninchenmuskel-Kreatinkinase und Hummermuskel-Argininkinase (Robin et al., 1976), Lysozym aus Hühnereiweiß und α-Lactalbumin vom Rind (Arnon und Maron, 1971).

Von allen getesteten Untereinheiten sind die σ-Faktoren untereinander am ähnlichsten (Tab. 6). Dieser Befund steht im Widerspruch zu den Ergebnissen, die wir bei der Komplementfixierung der Core- und Holoenzyme erhalten haben. Die im vorangegangenen Kapitel (S. 66 - 76) beschriebenen Versuche ergaben, daß die Holoenzyme und damit also auch die Untereinheit σ weniger miteinander verwandt sind als die σ-freien Coreenzyme. Dieser Widerspruch läßt sich nur dann verstehen, wenn man annimmt, daß die Ähnlichkeit zwischen dem E. coli und dem M. luteus σ-Faktor vorzugsweise, wenn nicht sogar ausschließlich auf die Bindungsstelle zum Coreenzym beschränkt ist.
Daß mit Ausnahme von σ die Reihenfolge im Vewandtschaftsgrad der Untereinheiten gemessen mit Anti-^{e}holo- bzw. Anti-^{m}holo-Serum nicht übereinstimmt, kann folgende Ursachen haben:

1. Die Untereinheiten der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase sind nicht in gleichem Maße immunogen. Es gibt Beispiele dafür, daß antigene Determinanten, die in dem einen Protein stark immunogen wirken, in einem anderen, verwandten Protein durch Veränderungen in der Aminosäuresequenz immunologisch inert sind (Reichlin, 1974; Welling et al., 1976). Margoliash et al. (1970) und Nisonoff et al. (1970) fanden, daß etwa ein Drittel der Antikörper gegen menschliches Cytochrom C nicht mit Macaca mulatta Cytochrom C reagiert, während umgekehrt mit dem Antiserum gegen Macaca mulatta Cytochrom C nicht zwischen menschlichem und Affen-Cytochrom C unterschieden werden kann. Der Austausch in Position 58 von Isoleucin beim Menschen zu Threonin beim Affen verändert das Protein so, daß diese Region im Macaca mulatta Cytochrom C keine Antikörper erzeugen kann.
2. Zwei miteinander verwandte antigene Determinanten wirken zwar beide noch in gleichem Maße immunogen,

sind aber andererseits durch Aminosäureaustausche in ihrer Struktur so verändert, daß die Reaktion mit dem jeweiligen heterologen Antikörper in der einen Richtung noch zu einer festen Antigen-Antikörper-Bindung führen kann, in der anderen Richtung jedoch sterisch gehindert ist, so daß keine oder nur eine sehr schwache Bindung mit dem heterologen Antikörper zustande kommt.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß im Falle der Untereinheiten der RNA-Polymerase das zweite Argument überwiegt, da eine Beeinflussung der Kreuzreaktion durch die unterschiedliche Immunogenität antigener Determinanten bisher nur an Proteinen aus Säugetieren beobachtet wurde. Reichlin (1970, 1972) konnte am Beispiel verschiedener Mutanten menschlichen Hämoglobins zeigen, daß die Ursache dafür in der Immuntoleranz zu sehen ist, die die immunisierten Kaninchen gegen die Bereiche des Antigens entwickeln, die in ihrem eigenen homologen Protein strukturgleich sind. Wenn ein Protein jedoch nur sehr wenig mit dem entsprechenden Protein des immunisierten Tieres verwandt ist, ist zu erwarten, daß alle Regionen des Proteins gleichmäßig immunogen wirken. Zwar gibt es Beispiele für Enzyme aus Bakterien und aus Eukaryonten, die sehr ähnlich gefaltet sind (Biesecker et al., 1977; Brayer et al., 1978), jedoch sind die Unterschiede in der Untereinheitenstruktur der prokaryotischen und eukaryotischen RNA-Polymerasen so groß (Roeder, 1976), daß wir annehmen können, daß Kaninchen gegen alle Bereiche des E. coli und M. luteus Enzyms Antikörper erzeugen.

3. Vergleich der Enzymaktivität in Gegenwart der Antiseren

Enzyme bieten bei immunologischen Untersuchungen zusätzlich die Möglichkeit, ihr antigenes Verhalten anhand ihrer biologischen Aktivität zu verfolgen. Im Unterschied zu anderen immunologischen Methoden besteht der Vorteil dieser Methode darin, daß man speziell Informationen über das aktive Zentrum des Enzyms erhält. Man kann also mit Hilfe verschiedener immunologischer Untersuchungsmethoden verschiedene Bereiche eines Proteins erfassen. Das ist vor allem deshalb interessant, weil in der Evolution viele Enzyme ihre Struktur stark verändert haben, während ihre katalytische Aktivität und Spezifität erhalten blieb. Isofunktionelle Enzyme zeigen daher häufig die größte Ähnlichkeit in Regionen, die für ihre katalytische Aktivität verantwortlich sind (Dayhoff, 1972).
Antikörper können die Aktivität eines Enzyms auf verschiedene Weise beeinflussen. Meistens führt die Reaktion des Enzyms mit seinem spezifischen Antikörper zu einer vollständigen oder partiellen Hemmung der Aktivität. In einigen Fällen wird das Enzym überhaupt nicht gehemmt. Als Ursache der Hemmung werden sterische Hinderung und Konformationsänderungen des Enzyms bei Einwirkung von Antikörpern diskutiert (Übersicht: Arnon, 1973). Es sind jedoch auch Fälle bekannt, daß Antikörper die Aktivität eines Enzyms stimulieren können. Wahrscheinlich beruht dieser Effekt auf einer Stabilisierung der aktiven Konformation des Moleküls durch den spezifischen Antikörper (Feinstein et al., 1971; Messer und Melchers, 1969).

Inkubiert man RNA-Polymerase aus E. coli über Nacht bei 4°C mit steigenden Mengen Immunglobulin*, so findet man,

*Für die im folgenden beschriebenen Versuche wurden die angereicherten Immunglobulinfraktionen benutzt, da bei Verwendung von komplettem Serum eine unspezifische Hemmung der RNA-Polymerase beobachtet wurde.

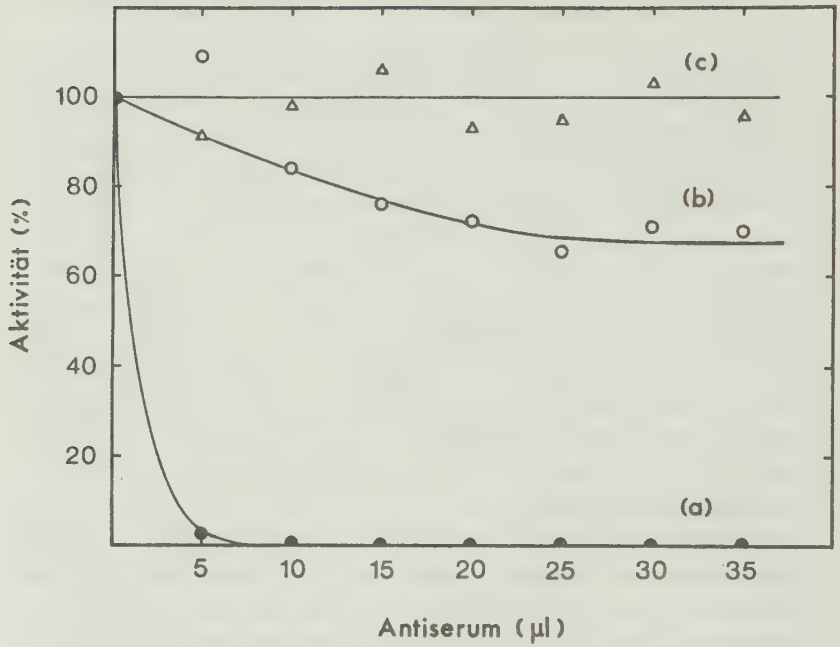


Fig. 23 Einfluß von Anti-^{e}holo-Serum auf die Aktivität von E. coli und M. luteus RNA-Polymerase

a) E. coli Holoenzym + Anti-^{e}holo-Serum
b) M. luteus Holoenzym + Anti-^{e}holo-Serum
c) M. luteus Holoenzym + Kontrollserum aus einem nicht immunisierten Kaninchen

Zu a): E. coli Holoenzym wurde mit 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7,9 (0,1 mM Dithioerythrit) auf eine Konzentration von 1,2 mg/ml verdünnt. Für jeden Testpunkt wurden 10 µl dieser Lösung in einen Ansatz pipettiert, der 20 µl 0,2 M Tris-HCl Puffer pH 7,9 (mit 0,4 mM EDTA, 20 % Glycerin und 0,4 mM Dithioerythrit) und 5 - 35 µl Immunglobulinlösung (29 mg/ml) enthielt. Die Lösungen wurden mit H_2O jeweils auf ein Endvolumen von 80 µl ergänzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.
Für den Aktivitätstest (vergl. Methoden, Kap. 4) wurden aus den vorher noch einmal gut durchmischten Lösungen (um eine

gleichmäßige Suspension der Antigen-Antikörper-Präzipitate zu erreichen) 70 µl entnommen.

Zu b) und c): Durchführung wie unter a) beschrieben, mit der Ausnahme, daß der für die M. luteus RNA-Polymerase verwendete 0,2 M Tris-HCl Puffer 68 % Glycerin enthielt.

Die in jedem Einzelversuch bestimmte Aktivität der RNA-Polymerase ohne Immunglobulin wurde gleich 100 % gesetzt. Bei dem E. coli Holoenzym entspricht 100 % Aktivität im Mittel einem Einbau an [^{14}C]UTP von 7 763 Ipm und bei M. luteus Holoenzym einem Einbau von 3 820 Ipm.
Standardabweichung für alle Versuche ≤ 14 %.

daß sowohl das Holo- als auch das Coreenzym durch ihren spezifischen Antikörper vollständig gehemmt werden (Fig. 23, Kurve a); Fig. 24, Kurve a)). Bei der Reaktion von M. luteus Holoenzym mit Anti-^{m}holo-Antikörper findet man einen Aktivitätsabfall bis auf etwa 5 % der Aktivität des ungehemmten Enzyms (Fig. 25, Kurve a)). Es konnte nicht mit Sicherheit geklärt werden, ob es sich dabei um eine echte Restaktivität des Enzyms handelt, da Blindversuche gezeigt haben, daß bei hohen Immunglobulinkonzentrationen Radioaktivität im Filterrückstand absorbiert werden kann.

Bei der Inkubation von E. coli Holo- und Coreenzym mit Anti-^{m}holo-Serum bleibt die Enzymaktivität zunächst konstant und nimmt erst bei hohen Antiserumkonzentrationen geringfügig ab (Fig. 25, Kurve b)). Da dieser Abfall auch bei Inkubation mit Immunglobulin aus normalem Kaninchen-Serum beobachtet wird, muß er als unspezifisch betrachtet werden. Anti-^{m}holo-Antikörper haben also keinen Einfluß auf die Aktivität der E. coli RNA-Polymerase bei Konzentrationen, die die M. luteus RNA-Polymerase nahezu vollständig hemmen.
Die Aktivität von M. luteus Holoenzym dagegen sinkt bei der Behandlung mit Antiserum, das gegen E. coli Core- oder Holoenzym gerichtet ist, im Vergleich zur Kontrolle mit normalem Kaninchenserum deutlich ab (Fig. 23, Kurve b

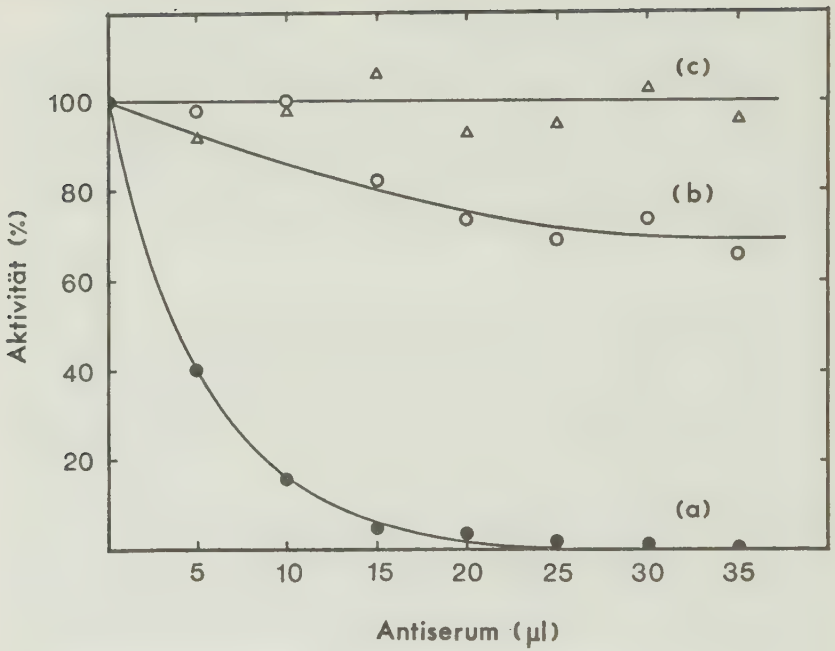


Fig. 24 Einfluß von Anti-^{e}core-Serum auf die Aktivität von E. coli und M. luteus RNA-Polymerase

a) E. coli Coreenzym + Anti-^{e}core-Serum
b) M. luteus Holoenzym + Anti-^{e}core-Serum
c) M. luteus Holoenzym + Kontrollserum aus einem nicht immunisierten Kaninchen

Durchführung der Versuche vergl. Legende zu Fig. 23.
100 % Aktivität entspricht bei E. coli Coreenzym im Mittel einem Einbau an [^{14}C]UTP von 6 508 Ipm.

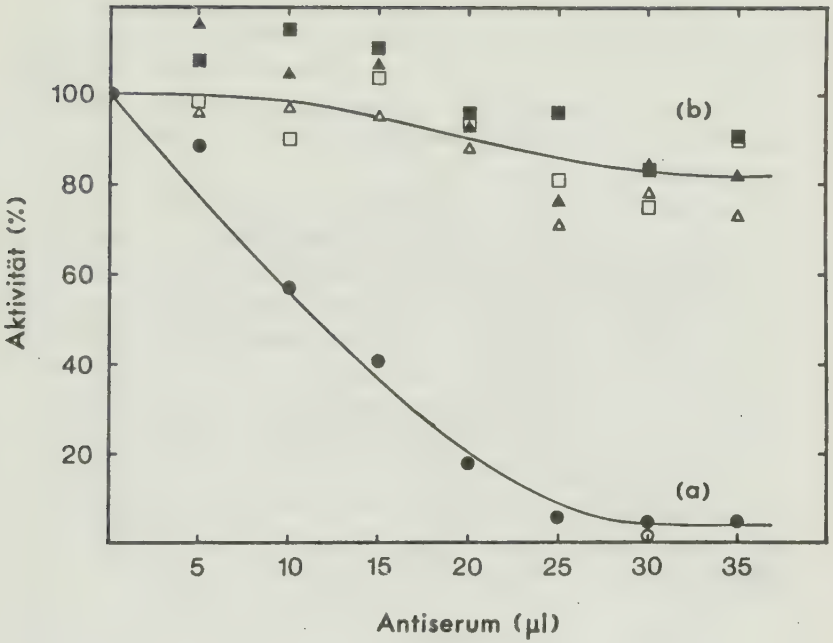


Fig. 25 Einfluß von Anti-^{m}holo-Serum auf die Aktivität von E. coli und M. luteus RNA-Polymerase

a) M. luteus Holoenzym + Anti-^{m}holo-Serum (●)
Um die im Filterrückstand absorbierte Radioaktivität (○) zu bestimmen, wurde ein Testansatz im Eisbad vor Zugabe der Enzymlösung mit 0,25 ml 50 mM EDTA versetzt und nach Zugabe der Enzymlösung sofort mit Äthanol gefällt (vergl. Methoden, Kap. 4)
b) E. coli Holoenzym + Anti-^{m}holo-Serum (▲)
E. coli Holoenzym + Kontrollserum (△)
E. coli Coreenzym + Anti-^{m}holo-Serum (■)
E. coli Coreenzym + Kontrollserum (□)
Durchführung der Versuche vergl. Legende zu Fig. 23.

und c); Fig. 24, Kurve b) und c)), bleibt aber dann auch noch bei höheren Antiserumkonzentrationen konstant auf etwa 70 % der Aktivität des ungehemmten Enzyms. Der Versuch wurde mit den Antiseren aus drei Kaninchen durchgeführt und brachte in allen Fällen übereinstimmende Ergebnisse.

Um die Spezifität dieser Hemmung zu überprüfen, wurde Anti-^{e}core-Serum mit E. coli RNA-Polymerase vorabsorbiert, um so die E. coli-spezifischen Antikörper zu präzipitieren. Der Überstand wurde dann mit M. luteus RNA-Polymerase inkubiert. Dabei wird keine Hemmung der Enzymaktivität mehr beobachtet (Fig. 26, Kurve a)). Das gleiche Resultat erhält man bei Vorabsorption von Anti-^{e}holo-Serum mit E. coli Holoenzym (ohne Beleg). Man muß aus diesen Ergebnissen schließen, daß die partielle Hemmung der M. luteus RNA-Polymerase durch Anti-E. coli-Serum auf eine spezifische Antigen-Antikörperreaktion zurückzuführen ist.

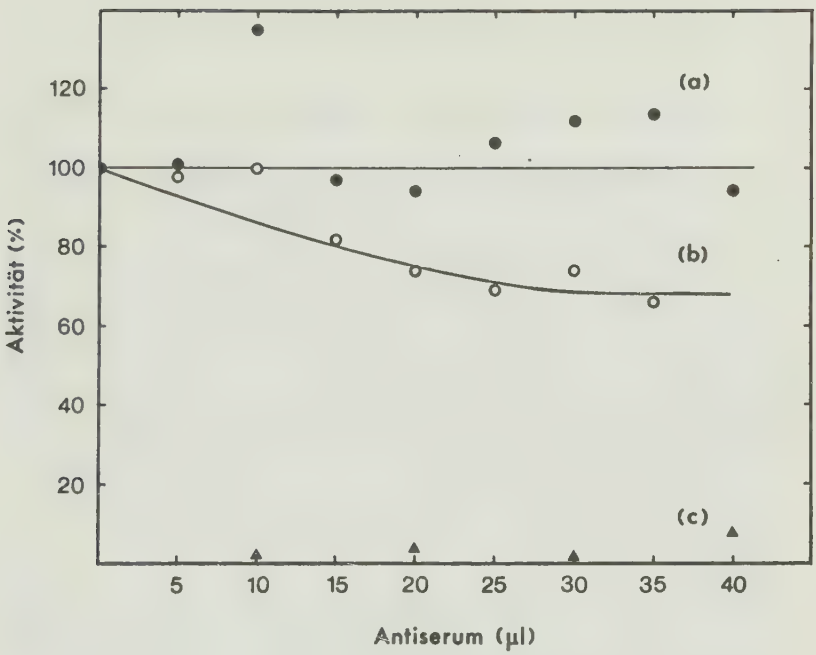


Fig. 26 Einfluß von Anti-^{e}core-Serum auf die Aktivität von M. luteus RNA-Polymerase nach Vorabsorption mit E. coli Coreenzym

a) M. luteus Holoenzym + Anti-^{e}core-Serum vorabsorbiert mit E. coli Coreenzym
Aus einer 110 mg Immunglobulin enthaltenden Lösung von Anti-^{e}core-Serum wurden die E. coli-spezifischen Antikörper mit 0,311 mg E. coli Coreenzym (berechnet nach Fig. 24, Kurve a)) präzipitiert. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurde in der Tischzentrifuge 15 min bei 3 000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde für den Test auf das gleiche Volumen wie das unbehandelte Anti-^{e}core-Serum verdünnt. Durchführung des Tests vergl. Legende zu Fig. 23.
b) M. luteus Holoenzym + unbehandeltes Anti-^{e}core-Serum
c) Kontrolltest auf E. coli Coreenzymaktivität in vorabsorbiertem Anti-^{e}core-Serum.

III. Immunologische Verwandtschaft mit anderen RNA-Polymerasen

1. Rifampicinsensitive und -resistente RNA-Polymerasen

Für die Rifampicinresistenz der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase ist eine Mutation in der Untereinheit β verantwortlich (Heil und Zillig, 1970; Lill, Behrendt und Hartmann, 1975). Da es sich dabei wahrscheinlich um den Austausch einer einzigen Aminosäure handelt, sind immunologische Untersuchungsmethoden mit Ausnahme der Mikrokomplementfixierung nicht empfindlich genug, um Strukturveränderungen entdecken zu können. Mit Hilfe des Komplementbindungstests gelang es jedoch in mehreren Proteinen, wie z. B. Hämoglobinen (Reichlin, 1972, 1974), alkalischen Phosphatasen (Cocks und Wilson, 1969) und β-Lactoglobulinen (Phillips et al., 1968), Punktmutationen zu unterscheiden.
Die Reaktion der resistenten RNA-Polymerasen von E. coli und M. luteus im Komplementbindungstest zeigt, daß die Mutation nicht zum Verlust einer antigenen Determinante geführt haben kann (Fig. 27 und Fig. 28). Die resistenten Coreenzyme binden bei gegebener Antiserumkonzentration die gleiche Menge Komplement wie die sensitiven Coreenzyme. Möglicherweise ist die RNA-Polymerase mit einem Molekulargewicht von ca. 400 000 im Vergleich zu den oben genannten Proteinen auch zu groß, als daß die Veränderung einer einzigen antigenen Determinante noch quantitativ erfaßt werden könnte.
Man findet jedoch bei den rifampicinresistenten Enzymen eine für Konformationsänderungen charakteristische Verschiebung der Komplementbindungsmaxima zu etwa der doppelten Antigenkonzentration (Fig. 27a und Fig. 28a), (vergl. Kap. II.2. S. 68). Dieser Effekt ist so groß, daß er nicht auf Unterschiede in der Präparation oder

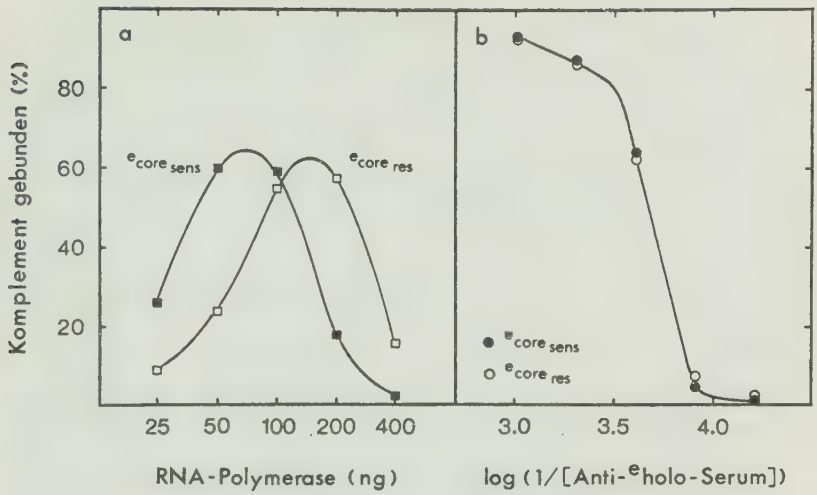


Fig. 27 Komplementfixierung der rifampicinsensitiven und -resistenten RNA-Polymerase aus E. coli mit Anti-^{e}holo-Serum

a) Abhängigkeit der Komplementfixierung von der RNA-Polymerasekonzentration
Beide Kurven wurden gleichzeitig in einem Versuch bestimmt (vergl. Methoden, Kap. 12).
Antiserumverdünnung 1 : 4 096

b) Abhängigkeit der Komplementfixierung von der Antiserumkonzentration
Jeder Punkt entspricht dem Maximum einer Komplementbindungskurve wie in a) dargestellt.

im Alter der Enzyme zurückgeführt werden kann. Die Enzyme waren zum Zeitpunkt des Tests voll aktiv. Man kann aus dem Umfang der horizontalen Verschiebung der Komplementbindungskurven schließen, daß die Mutation in der β-Unterein-

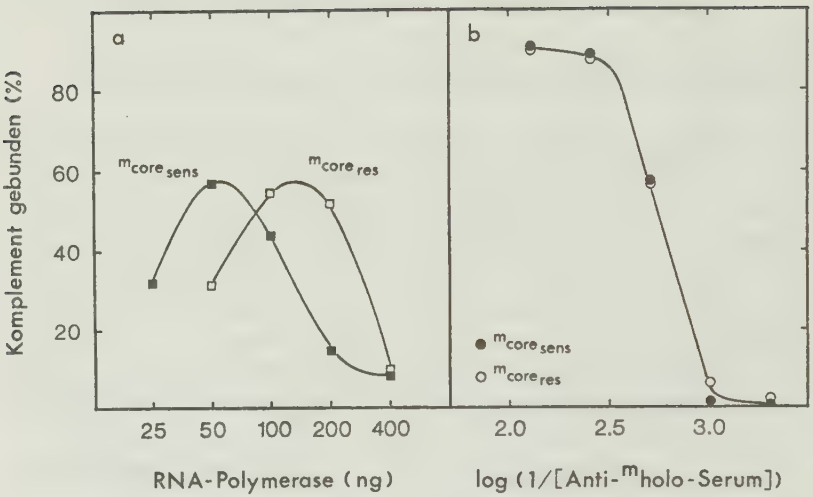


Fig. 28 Komplementfixierung der rifampicinsensitiven und -resistenten RNA-Polymerase aus M. luteus mit Anti-^{m}holo-Serum

a) Abhängigkeit der Komplementfixierung von der RNA-Polymerasekonzentration
Beide Kurven wurden gleichzeitig in einem Versuch bestimmt (vergl. Methoden, Kap. 12).
Antiserumverdünnung 1 : 512

b) Abhängigkeit der Komplementfixierung von der Antiserumkonzentration
Jeder Punkt entspricht dem Maximum einer Komplementbindungskurve wie in a) dargestellt.

heit zu einer Konformationsänderung des Moleküls führt, die möglicherweise mehrere immunologische Determinanten beeinflußt.

2. RNA-Polymerasen aus verschiedenen Organismen

Um einen allgemeinen Eindruck von der entwicklungsgeschichtlichen Veränderung der RNA-Polymerase in den verschiedenen Organismen zu gewinnen, wurden noch weitere bakterielle RNA-Polymerasen und eine eukaryotische RNA-Polymerase auf ihre immunologische Verwandtschaft mit E. coli und M. luteus RNA-Polymerase untersucht.

Vergleich durch Immundiffusion

Es wurde die Kreuzreaktion der RNA-Polymerasen aus Lactobacillen (L. curvatus und L. casei) und aus Bacillus stearothermophilus mit Anti-E. coli- und Anti-M. luteus-Serum durch Doppeldiffusion nach Ouchterlony (1962) geprüft. Außerdem wurde auch eine eukaryotische RNA-Polymerase, nämlich die DNA-abhängige RNA-Polymerase II aus Weizenkeimen, getestet.
Alle untersuchten RNA-Polymerasen geben mit Anti-^{e}holo-Serum auch nach ausgedehnten Inkubationszeiten keine Immunpräzipitate (Fig. 29a). Mit Anti-^{m}holo-Serum getestet, zeigen die bakteriellen RNA-Polymerasen eine sehr schwache, diffuse Bande (Fig. 29b). Einzig die RNA-Polymerase aus Weizenkeimen läßt auch hier keine Kreuzreaktion erkennen. Dies ist nicht weiter erstaunlich, da sich die Weizenkeim RNA-Polymerase II wie alle anderen bekannten eukaryotischen RNA-Polymerasen in ihrem Aufbau, in Zahl und Größe der Untereinheiten, deutlich von den bakteriellen Enzymen unterscheidet (Fig. 30).
Daß die bakteriellen RNA-Polymerasen mit Anti-^{m}holo-Serum gerade noch kreuzreagieren, mit Anti-^{e}holo-Serum dagegen nicht, läßt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, daß das Anti-^{m}holo-Serum etwas unspezifischer ist (vergl. Kap. II.2.).

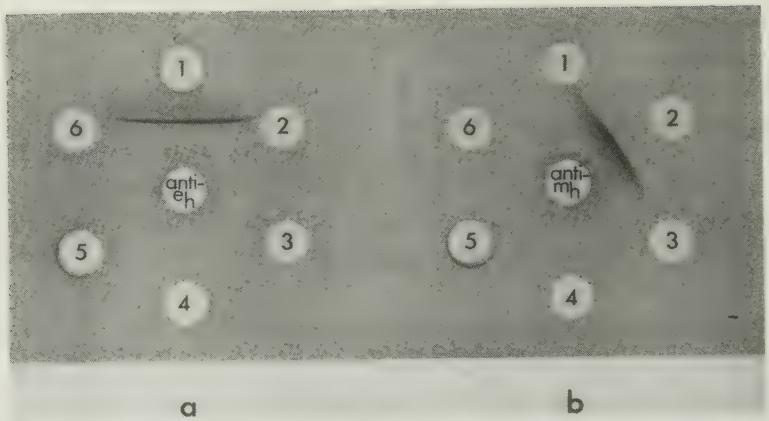


Fig. 29 Immundiffusion von RNA-Polymerasen aus verschiedenen Organismen

a) Reaktion mit Anti-^{e}holo-Serum
b) Reaktion mit Anti-^{m}holo-Serum

Das mittlere Loch enthielt jeweils 10 µl Antiserum. Die äußeren Löcher enthielten RNA-Polymerase aus (1) E. coli (12 µg), (2) M. luteus (11 µg), (3) Lactobacillus casei (Coreenzym, 10 µg), (4) Lactobacillus curvatus (10 µg), (5) Bacillus stearothermophilus (11 µg), (6) Weizenkeimen (13 µg). Durchführung vergl. Legende zu Fig. 15.

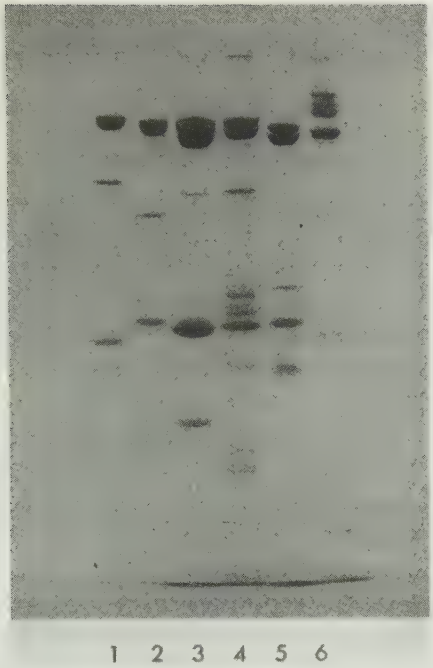


Fig. 30 Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von RNA-Polymerasen aus verschiedenen Organismen

(1) E. coli, (2) M. luteus, (3) Lactobacillus casei (Coreenzym), (4) Lactobacillus curvatus, (5) Bacillus stearothermophilus, (6) Weizenkeime

2 - 5 µg RNA-Polymerase wurden vor dem Auftragen 30 min bei 37 °C in 10 µl Probenpuffer (Laemmli, 1970) inkubiert. Trenngel: 10 % Acrylamid (vergl. Methoden, Kap. 5). Dauer der Elektrophorese: 17 h, Spannung: 60 V, Stromstärke: 8 - 10 mA.

Vergleich durch Mikrokomplementfixierung

Um die Kreuzreaktion der E. coli und M. luteus RNA-Polymerasen mit den RNA-Polymerasen aus anderen Organismen quantitativ bestimmen zu können, wurden Komplementbindungstests durchgeführt. Es wurden zusätzlich noch Enzyme aus Bakterien untersucht, die ihrer phylogenetischen Herkunft nach eine gute Kreuzreaktion mit den Antiseren gegen E. coli und M. luteus RNA-Polymerase geben sollten. Diese RNA-Polymerasen sollten als eine Art Maßstab dienen, um die Immunologischen Distanzen besser beurteilen zu können.
Mit Anti-^{m}holo-Serum wurden die RNA-Polymerasen aus Micrococcus lylae, Micrococcus varians und Staphylococcus aureus, und mit Anti-^{e}holo-Serum die RNA-Polymerase aus Serratia marcescens getestet. Die Komplementbindungsreaktion wurde mit Bakterienrohextrakten durchgeführt, die durch Ammoniumsulfatfraktionierung nach der Vorschrift von Burgess (1969a) angereichert worden waren. Der Anreicherungsschritt war notwendig, da der Rohsaft nach Aufschluß der Bakterien stark antikomplementär war (vergl. Methoden, Kap. 12). Außerdem wurden die Rohextrakte einer Desoxyribonuklease-Behandlung unterzogen, da am Beispiel der bakteriellen DNA-Polymerase I nachgewiesen worden war, daß die Bindung des Enzyms an DNA zu einer Erniedrigung der Komplementfixierungskurven führen kann (Tafler et al., 1973).

Untersuchung mit Anti-^{m}holo-Serum

Entsprechend den Ergebnissen der Immundiffusion zeigen die Lactobacillus casei, Lactobacillus curvatus und Bacillus stearothermophilus RNA-Polymerasen nur eine schwache Kreuzreaktion mit Anti-^{m}holo-Serum (Fig. 31), in der Größenordnung etwa der Kreuzreaktion des E. coli Enzyms vergleichbar (Tab. 7). Mit Weizenkeim RNA-Polymerase II läßt sich

Tab. 7 Immunologische Distanzen zu M. luteus RNA-Polymerase

	Immunologische Distanz
Micrococcus lylae	18
Micrococcus varians	96
Staphylococcus aureus	136
Escherichia coli	194
Lactobacillus casei	198
Lactobacillus curvatus	210
Bacillus stearothermophilus	213
Weizenkeime	>250

Die Immunologischen Distanzen wurden aus den Kurven von Fig. 31 graphisch bestimmt (vergl. Methoden, Kap. 12).

auch bei Konzentrationen bis zu 3,2 µg Enzym pro Testansatz keine Reaktion mehr nachweisen. Die Immunologischen Distanzen der untersuchten Micrococcenstämme M. lylae und M. varians und des mit M. luteus noch verhältnismäßig nahe verwandten Staphylococcus aureus sind erwartungsgemäß wesentlich kleiner als die mit E. coli RNA-Polymerase gefundene Immunologische Distanz. Sie sind in Tab. 8 den Immunologischen Distanzen gegenüber gestellt, die in analogen Versuchen mit Anti-M. luteus Katalase-Serum ermittelt wurden (Rupprecht und Schleifer, 1977). Man sieht, daß die Immunologischen Distanzen in ihrer Relation zueinander verhältnismäßig gut übereinstimmen, obwohl hier zwei völlig verschiedene Proteine untersucht wurden. Die für die RNA-Polymerasen gefundenen Werte liegen jedoch

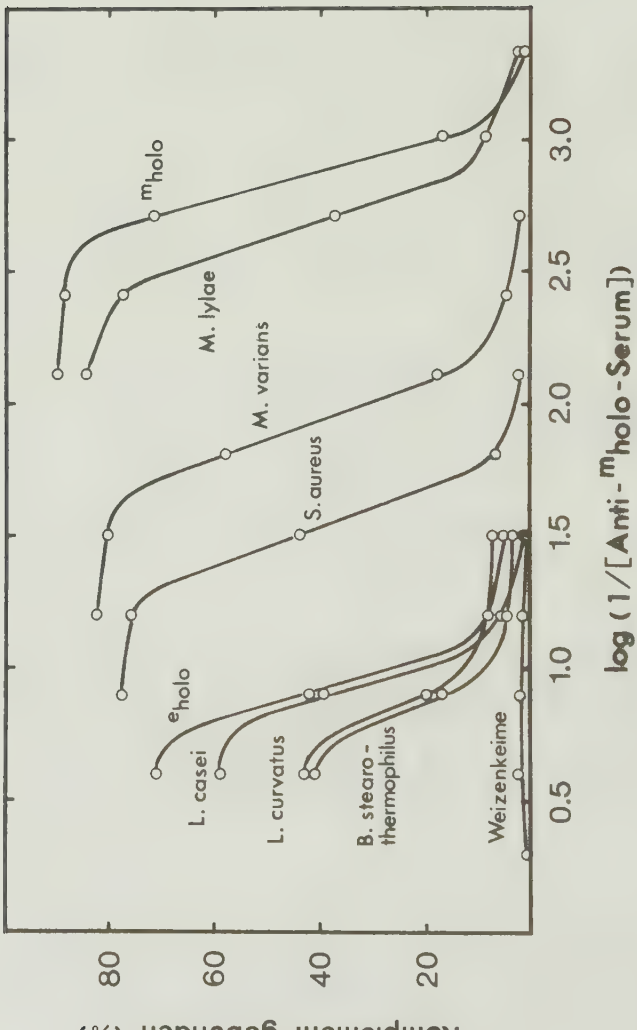

Komplement gebunden (%)
20
40
60
80
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
log (1/[Anti-mholo-Serum])
mholo
M. lylae
M. varians
S. aureus
ehalo
L. casei
L. curvatus
B. stearo-thermophilus
Weizenkeime

Fig. 31 Komplementfixierung der RNA-Polymerasen aus verschiedenen Organismen mit Anti-^{m}holo-Serum in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration

Die Versuche wurden wie in Methoden, Kap. 12, beschrieben durchgeführt. Die RNA-Polymerase aus Micrococcus lylae, Micrococcus varians und Staphylococcus aureus wurde in durch Ammoniumsulfatfällung fraktionierten Zellrohextrakten getestet (vergl. Methoden, Kap. 1).

in der Größenordnung unter den für die Katalase ermittelten Immunologischen Distanzen. Möglicherweise läßt sich dies darauf zurückführen, daß die RNA-Polymerase in Funktion und Aufbau ein sehr viel komplizierteres Enzym ist als die Katalase, und daß deshalb ihre Entwicklung konservativer verlaufen ist. Die Differenz ist jedoch nicht groß genug, als daß sie nicht auch auf Spezifitätsunterschieden der Antiseren beruhen könnte (vergl. Kap. II.2).

Tab. 8 Vergleich der mit Antiserum gegen M. luteus Katalase und mit Antiserum gegen M. luteus RNA-Polymerase gemessenen Immunologischen Distanzen

	Immunologische Distanz	
	Katalase (Rupprecht und Schleifer, 1977)	RNA-Polymerase
Micrococcus lylae	40	18
Micrococcus varians	135	96
Staphylococcus aureus	168	136

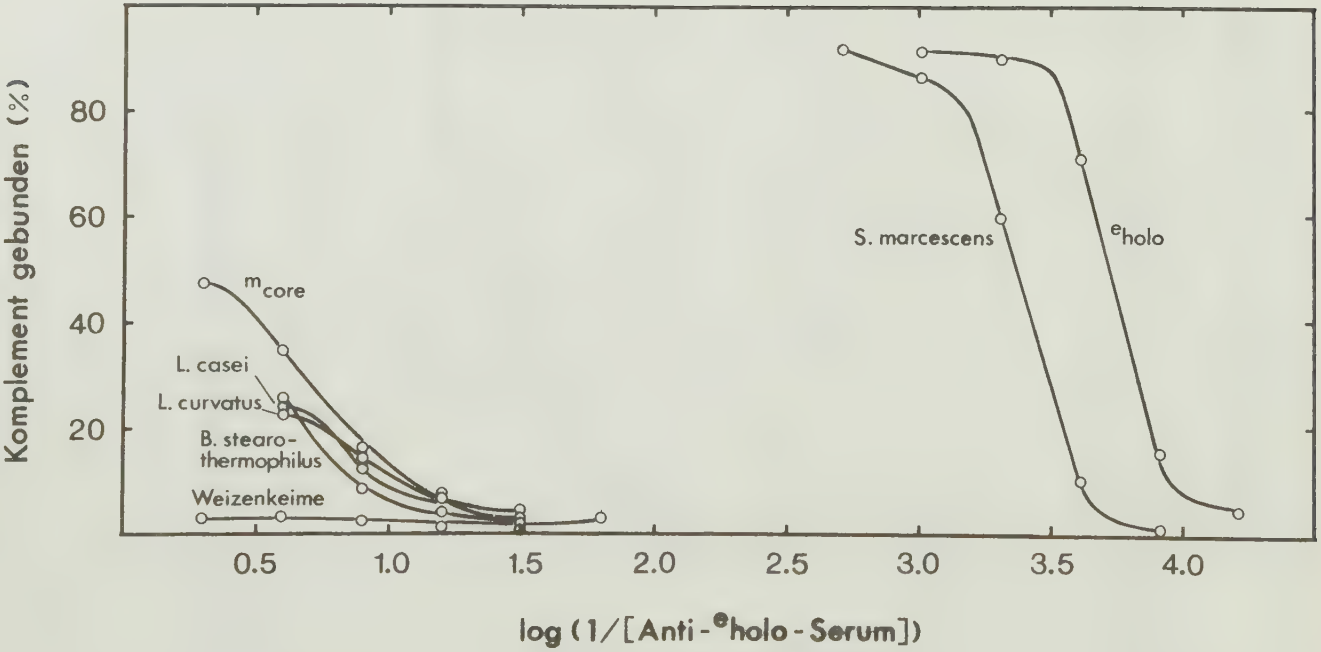

Komplement gebunden (%)
80
60
40
20
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
log (1/[Anti-^{e}holo-Serum])
^{m}core
L. casei
L. curvatus
B. stearo-thermophilus
Weizenkeime
S. marcescens
^{e}holo

Fig. 32 Komplementfixierung der RNA-Polymerasen aus verschiedenen Organismen mit Anti-^{e}holo-Serum in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration

Die Versuche wurden wie in Methoden, Kap. 12, beschrieben durchgeführt. Die RNA-Polymerase aus Serratia marcescens wurde in durch Ammoniumsulfatfällung fraktionierten Zellrohextrakten getestet (vergl. Methoden, Kap. 1).

Untersuchung mit Anti-^{e}holo-Serum

Auch mit Anti-^{e}holo-Serum findet man eine Kreuzreaktion der RNA-Polymerasen aus Lactobacillus casei, Lactobacillus curvatus und Bacillus stearothermophilus, jedoch ist sie noch schwächer als die Reaktion der M. luteus RNA-Polymerase (Fig. 32, Tab. 9). Weizenkeim RNA-Polymerase zeigt selbst bei einer Immunologischen Distanz von 370 noch keine Kreuzreaktion (Tab. 9). Die RNA-Polymerase aus Serratia marcescens gibt mit Anti-^{e}holo-Serum eine Immunologische Distanz von 35. Dieser Wert ist verhältnismäßig groß, wenn man bedenkt, daß die Enzyme aus E. coli und Serratia marcescens sonst sehr ähnlich sind (Konze-Thomas und Rüger, 1976). Die Untereinheiten haben in der Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese die gleichen Molekulargewichte. Die α-Untereinheiten sind sogar sehr wahrscheinlich identisch. Lipkin et al. (1976) fanden keinen Unterschied im tryptischen Fingerprint von E. coli α und Serratia marcescens α. Nach Befunden von Rüger (Vortrag am Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität München am 18. 5. 1977) bilden die α-Untereinheiten im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony konfluente Diffusionslinien aus, was für identische immunologische Determinanten spricht, während die Untereinheiten β und β′ jeweils über die entsprechende heterologe Untereinheit spornen und somit nur eine partielle Identität besitzen. Die Unterschiede zwischen der E. coli und Serratia marcescens RNA-

Tab. 9 Immunologische Distanzen zu E. coli RNA-Polymerase

	Immunologische Distanz
Serratia marcescens	35
Micrococcus luteus	310*
Lactobacillus curvatus	310*
Lactobacillus casei	320*
Bacillus stearothermophilus	330*
Weizenkeime	>370

Die Immunologischen Distanzen wurden aus den Kurven von Fig. 32 graphisch bestimmt (vergl. Methoden, Kap. 12).

*geschätzte Zahlen

Tab. 10 Vergleich der Immunologischen Distanzen von verschiedenen Enzymen aus E. coli und Serratia marcescens

	Immunologische Distanz
RNA-Polymerase	35
L-Asparaginase (Phillips et al., 1971)	36
DNA-Polymerase I (Tafler et al., 1973)	74 - 80
Alkalische Phosphatase (Cocks und Wilson, 1972)	121

Polymerase scheinen sich also ausschließlich auf die größeren Untereinheiten zu beschränken.
Vergleicht man die Immunologische Distanz zwischen den beiden RNA-Polymerasen mit den Immunologischen Distanzen, die mit anderen Proteinen aus den gleichen Organismen bestimmt wurden, so findet man zum Teil eine sehr gute Übereinstimmung (Tab. 10). Immunologische Untersuchungen der ribosomalen Proteine aus E. coli und Serratia marcescens ergaben ebenfalls deutliche Unterschiede, obwohl sich viele der Proteine in Größe und Ladung gleichen (Geisser et al., 1973).

Diskussion

Die Verwandtschaft der E. coli RNA-Polymerase mit RNA-Polymerasen aus anderen Bakterien wurde bereits mehrfach untersucht. Lipkin et al. (1976) verglichen die α-Untereinheiten der RNA-Polymerasen aus einigen Enterobakterien im tryptischen Fingerprint. Sie fanden, daß die Peptidkarten der Untereinheit α aus E. coli B, E. coli K 12 und Serratia marcescens völlig identisch sind. Auf der Peptidkarte der α-Untereinheit der RNA-Polymerase aus Proteus mirabilis fanden sie die Position von nur fünf Peptiden verändert im Vergleich zur Position der entsprechenden Peptide der α-Untereinheit von E. coli B RNA-Polymerase. Lipkin et al. schlossen daraus, daß die Primärstruktur der α-Untereinheiten in der Evolution besonders gut konserviert wurde.

Fukuda et al. (1977) untersuchten die RNA-Polymerasen aus E. coli, Salmonella typhimurium, Salmonella anatum, Serratia marcescens, Aerobacter aerogenes, Proteus mirabilis und Bacillus subtilis mit Hilfe immunologischer Methoden. Sie fanden, daß sämtliche RNA-Polymerasen mit Anti-E. coli-Serum Immunpräzipitate bilden, und daß die Polymeraseaktivität im Bakterienrohextrakt durch Antikörper gegen E. coli Holoenzym und durch Antikörper gegen die Untereinheiten $^{e}\beta$ und $^{e}\beta'$ inhibiert wird, allerdings mit graduellen Unterschieden. Am schwächsten wird Bacillus subtilis RNA-Polymerase gehemmt.

Weiterhin fanden Fukuda et al., daß sich die RNA-Polymerasen aus Salmonella typhimurium, Serratia marcescens und Aerobacter aerogenes in Größe und Ladung ihrer Untereinheiten überhaupt nicht, und die RNA-Polymerasen aus Proteus mirabilis und Salmonella anatum kaum von E. coli RNA-Polymerase unterscheiden. Einzig Bacillus subtilis RNA-Polymerase zeigt größere Unterschiede in Molekulargewicht und

isoelektrischem Punkt der Untereinheiten im Vergleich zu den anderen RNA-Polymerasen.
Beide Arbeitsgruppen beschränkten sich jedoch bei ihren Untersuchungen auf den Vergleich von RNA-Polymerasen, die durch Präzipitation mit Antiserum gegen E. coli RNA-Polymerase aus Bakterienrohextrakten angereichert werden können und trafen damit im voraus eine Auswahl besonders verwandter Enzyme. Daher lassen diese Ergebnisse nicht den Schluß zu, daß die RNA-Polymerase generell ein sehr konservatives Enzym ist.
In der vorliegenden Arbeit wurden die RNA-Polymerasen aus zwei phylogenetisch sehr weit voneinander entfernten Organismen untersucht: Der gramnegative Organismus Escherichia coli gehört zur Familie der Enterobakterien und hat ein DNA-Basenverhältnis von (A + T)/(G + C) = 0,99 (Belozersky und Spirin, 1960). Der grampositive Organismus Micrococcus luteus dagegen gehört zur Familie der Micrococcaceae und hat ein DNA-Basenverhältnis von (A + T)/(G + C) = 0,39 (Belozersky und Spirin, 1960).
Die Untereinheiten der RNA-Polymerasen aus E. coli und M. luteus unterscheiden sich deutlich in Molekulargewicht und Ladung (Lill, Behrendt und Hartmann, 1975; Lill et al., 1977; diese Arbeit, Kap. I.2. S. 53).
Die Analyse des tryptischen Fingerprints der beiden α-Untereinheiten ergibt kaum eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz. Nur 13 Peptide der insgesamt 32 ($^{e}\alpha$) bzw. 46 ($^{m}\alpha$) finden sich in identischen Positionen (Fig. 9 und Fig. 10). Bei der Bromcyanspaltung der Untereinheiten α, β und β′ entstehen keine Fragmente mit identischem Molekulargewicht (Fig. 11).
Auch die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen sprechen für eine sehr geringe Verwandtschaft der RNA-Polymerasen aus E. coli und M. luteus. Im Doppeldiffusionstest zeigen die Enzyme kaum eine Reaktion mit dem heterologen Antiserum. Die durch Mikrokomplementfixie-

rung bestimmten Immunologischen Distanzen zwischen 200 und 300 liegen bereits an der Erfassungsgrenze der Methode (Tab. 5).
Ähnlich große Immunologische Distanzen wurden auch mit Lactobacillus casei, Lactobacillus curvatus und Bacillus stearothermophilus RNA-Polymerase gegen Anti-^{e}holo- und Anti-^{m}holo-Serum gemessen (Tab. 7 und Tab. 9). Nur die RNA-Polymerase aus dem ebenfalls den Enterobakterien zugehörigen Organismus Serratia marcescens zeigt im Komplementbindungstest in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Fukuda et al. (1977) und Rüger (Vortrag am Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität München am 18. 5. 1977) eine sehr nahe Verwandtschaft zu E. coli RNA-Polymerase (Tab. 9). Kleine Immunologische Distanzen findet man auch bei Micrococcus lylae, Micrococcus varians und Staphylococcus aureus RNA-Polymerase im Test mit Anti-^{m}holo-Serum, entsprechend ihrer nahen phylogenetischen Verwandtschaft mit M. luteus (Tab. 7). Der Vergleich dieser Ergebnisse mit immunologischen Untersuchungen an anderen Bakterienproteinen zeigt, daß die bakterielle RNA-Polymerase keineswegs ein sehr konservatives Enzym ist (vergl. Tab. 8 und 10).
Umso erstaunlicher ist es daher, daß die RNA-Polymerase über Speziesgrenzen hinaus aktive Hybridenzyme zu bilden vermag, nicht nur zwischen nahe verwandten Bakterien wie E. coli und Serratia marcescens (Konze-Thomas und Rüger, 1976), sondern sogar zwischen Organismen, bei denen eine Verwandtschaft kaum nachweisbar ist, wie E. coli und Bacillus stearothermophilus (W. Rüger, Votrag am Institut für Mikrobiologie der TUM am 18. 5. 1977) und E. coli und M. luteus (Lill, Behrendt und Hartmann, 1975). Im folgenden Abschnitt wird versucht, auf die besondere Art der Strukturerhaltung, die die RNA-Polymerase dazu befähigt, und die sich den klassischen Methoden der Bakterientaxonomie entzieht, näher einzugehen.

Neben der Aminosäuresequenz ist die Faltung der Polypeptidkette ein wesentliches Kriterium für die Verwandtschaft von Proteinen. In den letzten Jahren wurde durch vergleichende Röntgenstrukturanalyse eine Ähnlichkeit zwischen Proteinen entdeckt, die sich bei völlig verschiedener Aminosäuresequenz allein in der Topologie der Tertiärstruktur äußert (Blake und Swann, 1971; Richardson et al., 1976; Rossmann und Argos, 1977). Ein Beispiel für diese Art der Strukturkonservierung sind auch die beiden Domänen der Rhodanese aus Rinderleber (Ploegman et al., 1978a,b). Sie entstanden vermutlich durch Genduplikation und entwickelten sich anschließend unabhängig voneinander weiter. Die beiden Domänen enthalten 142 bzw. 135 Aminosäuren, wobei je 117 mit einer maximalen Abweichung von nicht mehr als 1,95 Å beinahe die exakt gleiche Position innerhalb der Raumstruktur der Domänen einnehmen. Von den 117 positionsgleichen Paaren sind jedoch nur 15 Aminosäuren miteinander identisch.
Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß die dreidimensionale Gestalt eines Proteins in der Evolution sehr viel besser konseviert wird als die Primärstruktur. Offensichtlich ist die Raumstruktur eines Proteins für seine Funktion wichtiger als die Aminosäuresequenz.
Jedoch ist die Variationsbreite in der Anordnung der Aminosäuren entlang der Polypeptidkette dadurch eingeschränkt, daß die Tertiärstruktur eines Proteins in seiner Aminosäuresequenz determiniert sein muß; denn alle Proteine können sich spontan in die richtige Raumstruktur falten (Anfinsen und Scheraga, 1975; Schulz, 1977). Da nicht allen Bereichen eines Proteins die gleiche Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Raumstruktur zukommt, sind Unterschiede in der Mutationsrate der Aminosäuren je nach ihrer Anordnung im Proteinmolekül zu erwarten. Bestimmte invariante Gruppierungen von Aminosäuren werden nicht oder nur konservativ (z. B. geladene

gegen geladene oder apolare gegen apolare Seitenketten) ausgetauscht. Die Verteilung der hydrophoben Aminosäuren entlang der Polypeptidkette scheint ein besonders kritischer Faktor für die Proteinfaltung zu sein (Ploegman et al., 1978b). Zum Beispiel enthalten die beiden Domänen der Rinderleberrhodanese je zwei Cluster von insgesamt 38 hydrophoben Aminosäuren, die ihre Position zwar nicht in der Aminosäuresequenz, aber doch in der dreidimensionalen Struktur exakt beibehalten haben.
Vielleicht läßt sich in diesem Sinne auch der erstaunliche Befund verstehen, daß die α-Untereinheiten der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase, die im tryptischen Fingerprint kaum Anhaltspunkte für identische Sequenzbereiche geben, eine auffallende Ähnlichkeit im Verteilungsmuster der Methioninreste auf der Polypeptidkette bewahrt haben (vergl. Fig. 14).

Ein weiteres Merkmal bei strukturverwandten Proteinen scheint die Häufung von Mutationen an der Proteinoberfläche zu sein, während die im Molekülinneren befindlichen Teile der Polypeptidkette weniger stark verändert werden. Champion et al. (1975) errechneten aus den Daten der Röntgenstruktur- und Sequenzanalyse verschiedener Proteine wie Cytochrom C, Myoglobin, Lysozym, Ribonuklease und Parvalbumin, daß innerhalb jeder Gruppe etwa 80 - 90 % der variablen Aminosäurepositionen an der Oberfläche des Proteins liegen. Zweifellos haben Aminosäuresubstitutionen im Inneren eines Proteins einen größeren Einfluß auf die dreidimensionale Gestalt des Moleküls als Aminosäuresubstitutionen an der Proteinoberfläche. In Einklang damit steht auch der Befund aus der Röntgenstrukturanalyse, daß bei strukturverwandten Proteinen die Positionen der Aminosäuren im Molekülinneren weniger stark voneinander abweichen als in außen liegenden Kettenabschnitten, wo sogar Insertionen bzw. Deletionen größerer

Sequenzstücke vorkommen können (Richardson et al., 1976; Ploegman et al., 1978b).
Mit immunologischen Untersuchungen werden, wenn nicht zuvor eine Auffaltung des Proteins z. B. durch Denaturierung erfolgt (Sela, 1973), ausschließlich Aminosäuresubstitutionen und Strukturveränderungen der Proteinoberfläche erfaßt (Reichlin, 1975). Dies fällt umso mehr ins Gewicht, je größer das betreffende Protein ist.
Bei Enzymen, die aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt sind, liegt die Vermutung nahe, daß die Bindungsstellen zwischen den Untereinheiten im Verlauf der Evolution besonders gut konserviert wurden. Dafür sind zwei Gründe denkbar: Bei der RNA-Polymerase und bei vielen anderen Proteinen haben die isolierten Untereinheiten keine katalytische Aktivität, sondern erfüllen ihre Funktion nur gemeinsam im Enzymkomplex. Zweifellos ist dafür eine exakte Paßform Voraussetzung. Zweitens ist es für die Bildung des Enzymkomplexes erforderlich, daß sich die Untereinheiten gegenseitig erkennen, um sich zur richtigen Quartärstruktur zusammenfügen zu können. Beide Argumente machen eine größere strukturelle Veränderung im Bereich der Kontaktstellen ohne eine gleichzeitige Beeinträchtigung der Enzymfunktion wenig wahrscheinlich.
Bei der RNA-Polymerase sprechen vor allem drei Befunde für eine Konservierung der Bindungsstellen zwischen den Untereinheiten:

1. Die Untereinheiten der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase können aktive Hybridenzyme bilden (Lill, Behrendt und Hartmann, 1975).
2. Die Untereinheiten zeigen im Mikrokomplementbindungstest eine bessere Kreuzreaktion als die nicht dissoziierten Enzyme (vergl. Fig. 20, Fig. 22 und Tab. 6).
3. Man findet mit einer Ausnahme eine Übereinstimmung zwischen der Substituierbarkeit einer Untereinheit im heterologen Enzym und ihrer Kreuzreaktion mit dem

heterologen Antikörper.
Das zuletzt genannte Argument soll im folgenden näher erläutert werden:
Ebenso wie bei der Formierung eines Enzymkomplexes aus den Untereinheiten sind auch bei der Reaktion von Antigen und Antikörper zum Antigen-Antikörper-Komplex genau zueinander passende, komplementäre Proteinoberflächen erforderlich, um einen engen Kontakt und damit eine stabile Bindung zwischen den Proteinen zu ermöglichen. Wenn man nun davon ausgeht, daß kein prinzipieller Unterschied in der Art der Wechselwirkungen zwischen zwei Untereinheiten im Enzymkomplex und zwischen Untereinheit und Immunglobulin im Antigen-Antikörper-Komplex besteht, so muß man annehmen, daß Antikörper, die gegen die Kontaktflächen einer Untereinheit gerichtet sind, in ihrer Struktur die Umgebung der Untereinheit im Enzymkomplex widerspiegeln. Bei einem besonders aktiven Enzymhybrid sollte daher die Immunologische Distanz der ausgetauschten Untereinheit gemessen mit dem Antiserum, das gegen das parentale Enzym gerichtet ist, besonders klein sein.
Bei der RNA-Polymerase aus E. coli und M. luteus läßt sich eine solche Parallele herstellen (Tab. 11). Man findet eine gute Übereinstimmung zwischen Hybridisierbarkeit und Immunologischer Distanz mit Ausnahme der Untereinheit $^{e}\alpha$. Jedoch sind die mit Anti-^{e}holo-Serum gemessenen Immunologischen Distanzen allgemein sehr hoch, so daß eine genaue Bestimmung nicht möglich war und der in Tab. 11 für α angegebene Wert nur geschätzt werden konnte (vergl. Kap. II. 2.).
Ferner ergaben die Komplementfixierungsversuche, daß die σ-Untereinheiten von allen Untereinheiten am besten miteinander kreuzreagieren (Tab. 6), daß diese Verwandtschaft jedoch nahezu ausschließlich auf die Kontaktstellen zum Coreenzym beschränkt sein muß (vergl. Kap. II. 2. S. 81). In Analogie zu diesem Befund bildet M. luteus σ-Faktor

Tab. 11 Vergleich der enzymatischen Aktivität der Hybride mit der Immunologischen Distanz der ausgetauschten Untereinheit

Hybridenzym	Synthese an Lachssperma DNA nach 5 h Inkubation (Behrendt, 1975) (Ipm)	Immunologische Distanz der ausgetauschten Untereinheit gemessen mit Anti-^{e}holo-Serum
$^{m}\alpha + {}^{e}\beta + {}^{e}\beta'$	3 744	230*
$^{e}\alpha + {}^{e}\beta + {}^{m}\beta'$	382	220
$^{e}\alpha + {}^{m}\beta + {}^{e}\beta'$	70	270*
		Immunologische Distanz der ausgetauschten Untereinheit gemessen mit Anti-^{m}holo-Serum
$^{m}\alpha + {}^{e}\beta + {}^{m}\beta'$	608	86
$^{e}\alpha + {}^{m}\beta + {}^{m}\beta'$	214	167
$^{m}\alpha + {}^{m}\beta + {}^{m}\beta'$	47	180

*geschätzte Zahlen

mit E. coli Coreenzym ein sehr aktives Hybrid (Lill et al., 1977), welches andererseits eine modifizierte Ablesespezifität an Phagen DNA im Vergleich zu E. coli Holoenzym zeigt (Ernst, 1978). Allerdings fiel der Gegenversuch nicht in der entsprechenden Weise aus. M. luteus Coreenzym läßt sich zwar mit E. coli σ-Faktor ebenfalls stimulieren, jedoch mit weitaus geringerer Effektivität (Lill, Behrendt und Hartmann, 1975).

Ungeklärt bleibt noch, warum trotz der guten Kreuzreaktion der Untereinheiten im Komplementfixierungstest keine Immunpräzipitate im Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel gefunden werden konnten (Fig. 18). Vielleicht ist die Zahl der gemeinsamen antigenen Determinanten auf den Kontaktflächen für eine Vernetzung der Antigen-Antikörper-Komplexe nicht ausreichend. Eine andere mögliche Erklärung wäre, daß die Anwesenheit von Dodecylsulfat bei einer heterologen Immunreaktion stärker stört, weil die Antigen-Antikörper-Bindung weniger stabil ist als bei einer homologen Immunreaktion (vergl. Fig. 19 und Fig. 21).
Die RNA-Polymerase ist nicht das einzige Beispiel eines heterologen Enzymkomplexes, dessen Untereinheiten in der Evolution unterschiedlich gut konserviert wurden. Ähnliche Befunde ergaben auch immunologische Untersuchungen an ribosomalen Proteinen aus Bakterien (Geisser et al., 1973a,b; Higo et al., 1973).
Die Konservierung der Kontaktstellen zwischen Enzymuntereinheiten im Verlauf der Evolution wird durch zahlreiche Enzymhybridisierungen zwischen phylogenetisch weit auseinanderliegenden Organismen belegt (Übersicht: Hartmann, 1976). In einigen Fällen gelang es sogar, Untereinheiten zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Enzymen auszutauschen.

Konservative Strukturbereiche bei isofunktionellen Enzymen sind ferner auch in der Gegend des aktiven Zentrums zu erwarten, da die an der katalytischen Reaktion beteiligten Enzymbereiche der unveränderlichen Form des Substrats genau angepaßt sein müssen. Tatsächlich werden bei isofunktionellen Enzymen häufig Sequenzhomologien am aktiven Zentrum beobachtet (Li und Yanofsky, 1972; James et al., 1978; Zusammenfassung vergl. Dayhoff, 1972).
Rossmann und Argos (1976) fanden, daß die Raumstruktur der Polysaccharidbindungsfalte von Hühnereiweißlysozym

und von Phagenlysozym nahezu deckungsgleich ist, während die übrigen Bereiche des Moleküls völlig unterschiedlich gefaltet sind. Ebenso ergab die Röntgenstrukturanalyse für die NAD-Bindungsstelle von Laktatdehydrogenase und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und für das aktive Zentrum der Proteasen Subtilisin und Carboxypeptidase eine ausgeprägte Strukturäquivalenz (Rossmann und Argos, 1977).
Eine strukturelle Ähnlichkeit am aktiven Zentrum verwandter Proteine läßt sich auch mit Hilfe inhibierender Antikörper aufdecken (Arnon, 1973). Unsere Untersuchungen an der RNA-Polymerase aus E. coli und M. luteus ergaben, daß Antiserum gegen E. coli RNA-Polymerase die Aktivität des M. luteus Enzyms an Lachssperma DNA partiell inhibiert (vergl. Kap. II.3., Fig. 23 und 24). Diese Hemmung geht auf E. coli-spezifische Antikörper zurück (Fig. 26) und wirkt sich schon bei relativ kleinen Antikörperkonzentrationen aus, die sogar geringer sein können als bei der Komplementfixierungsreaktion. Wie die Konservierung der Kontaktstellen zwischen den Untereinheiten spricht dieser Befund dafür, daß die für die Funktion essentiellen Bereiche der RNA-Polymerase trotz der großen phylogenetischen Unterschiede zwischen E. coli und M. luteus bewahrt blieben. Daß der entsprechende Versuch mit Anti-^{m}holo-Serum nicht in der erwarteten Weise ausfiel, ist möglicherweise auf den geringen Gehalt an hemmenden Antikörpern in diesem Antiserum zurückzuführen (Fig. 25, Tab. 1).

Literaturverzeichnis

Anfinsen, C.B. und Scheraga, H.A. (1975) "Experimental and Theoretical Aspects of Protein Folding", Adv. Protein Chem. 29, 205 - 300

Arnheim, N., Sobel, I. und Canfield, R. (1971) "Immunochemical Resemblance between Human Leukemia and Hen Egg-white Lysozyme and their Reduced Carboxymethyl Derivatives", J. Mol. Biol. 61, 237 - 250

Arnheim, N. (1973) "The Evolution of Proteins" in "The Antigens" (Sela, M., ed.) 1, 378 - 415

Arnon, R. und Sela, M. (1969) "Antibodies to a Unique Region in Lysozyme Provoked by a Synthetic Antigen Conjugate", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 163 - 170

Arnon, R. und Maron, E. (1971) "An Immunological Approach to the Struktural Relationship between Hen Egg-white Lysozyme and Bovine α-Lactalbumin", J. Mol. Biol. 61, 225 - 235

Arnon, R. (1973) "Immunochemistry of Enzymes" in "The Antigens" (Sela, M., ed.) 1, 87 - 159

Arnon, R. (1974) "Conformation and Physico-chemical Factors Influenzing Antigenicity" in "Progress in Immunology II" (Brent, L. und Holborow J., eds.) Vol. 2, North-Holland Publishing Company, pp. 5 - 15

Bates, D.L., Perham, R.N. und Coggins, J.R. (1975) "Methods for Obtaining Peptide Maps of Proteins on a Subnanomole Scale", Anal. Biochem. 68, 175 - 184

Behrendt, E.M. (1975) "Untereinheiten der Micrococcus luteus RNA-Polymerase und ihre Hybridisierung mit den Untereinheiten der RNA-Polymerase von Escherichia coli" Dissertation, Universität Würzburg

Belozersky, A.N. und Spirin, A.S. (1960) "Chemistry of the Nucleic Acids of Microorganisms" in "The Nucleic Acids" (Chargaff, E. und Davidson, J.N., eds.), Academic Press, New York and London, pp. 147 - 185

Berg, D. und Chamberlin, M. (1970) "Physical Studies on Ribonucleic Acid Polymerase from Escherichia coli B" Biochemistry 9, 5055 - 5064

Biesecker, G., Harris, J.I., Thierry, J.C., Walker, J.E. und Wonacott, A.J. (1977) "Sequence and Structure of D-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus", Nature 266, 328 - 333

Blake, C.C.F. und Swann, I.D.A. (1971) "X-Ray Analysis of Structure of Human Lysozyme at 6 Å Resolution", Nature 232, 12 - 15

Brayer, G.D., Delbaere, L.T.J. und James, M.N.G. (1978) "Molecular Structure of Crystalline Streptomyces griseus Protease A at 2,8 Å Resolution. II. Molecular Conformation, Comparison with α-Chymotrypsin and Active-site Geometry", J. Mol. Biol. 124, 261 - 283

Burgess, R.R., Travers, A.A., Dunn, J.J. und Bautz, E.K.F. (1969) "Factor Stimulating Transcription by RNA Polymerase", Nature 221, 43 - 46

Burgess, R.R. (1969a) "A New Method for the Large Scale Purification of Escherichia coli Deoxyribonucleic Acid-Dependent Ribonucleic Acid Polymerase", J. Biol. Chem. 244, 6160 - 6167

Burgess, R.R. (1969b) "Separation and Characterisation of the Subunits of Ribonucleic Acid Polymerase", J. Biol. Chem. 244, 6168 - 6176

Burgess, R.R. und Jendrisak J.J. (1975) "A Procedure for the Rapid, Large Scale Purification of Escherichia coli DNA Dependent RNA Polymerase Involving Polymin P Precipitation and DNA-Cellulose Chromatography", Biochemistry 14, 4634 - 4639

Burgess, R.R. (1976) "Purification and Physical Properties of Escherichia coli RNA Polymerase" in "RNA-Polymerase" (Losick, R., and Chamberlin, M., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 69 - 100

Burgess, R.R., Gross, C. und Engbaek, F. (1976) "Cysteine and Methionine Content of the Escherichia coli Ribonucleic Acid Polymerase Subunits", J. Bacteriol. 128, 390 - 421

Campbell, D.H., Garvey, J.S., Cremer. N.E. und Sussdorf, D.H. (1970) "Methods in Immunology", W.A. Benjamin, Inc., Reading, Massachusetts

Canfield, R.E. (1963) "Peptides Derived from Tryptic Digestion of Egg White Lysozyme", J. Biol. Chem. 238, 2691 - 2697

Champion, A.B., Prager, E.M., Wachter, D. und Wilson, A.C. (1974) "Microcomplementfixation" in "Biochemical and Immunological Taxonomy of Animals" (Wrigth, C.A., ed.), Academic Press, New York and London, pp. 397 - 416

Champion, A.B., Soderberg, K.L., Wilson, A.C. und Ambler, R.P. (1975) "Immunological Comparison of Azurins of Known Amino Acid Sequence", J. Mol. Evol. 5, 291 - 305

Cocks, G.T. und Wilson, A.C. (1969) "Immunological Detection of Single Amino Acid Substitutions in Alkaline Phosphatase", Science 164, 188 - 189

Cocks, G.T. und Wilson, A.C. (1972) "Enzyme Evolution in the Enterobacteriaceae", J. Bacteriol. 110, 793 - 802

Dayhoff, M.O. (1972) "Atlas of Protein Sequence and Sructure", National Biochemical Research Foundation, Georgetown University Medical Center, Washington

Ernst, H. (1978) "Untersuchungen über die Transkriptionsspezifität der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen aus Escherichia coli und Micrococcus luteus und den Einfluß der Sigma-Untereinheit in vitro", Diplomarbeit, Universität München

Feinstein, R.N., Jaroslow, B.N., Howard, J.B. und Faulhaber, J.T. (1971) "Stabilization of Mutant Catalase by Complex Formation with Antibody to Normal Catalase", J. Immunol. 106, 1316 - 1322

Felix, A.M. und Jimenez, M.H. (1974) "Usage of Fluorescamine as a Spray Reagent for Thinlayer Chromatography", J. Chromatogr. 89, 361 - 364

Fujiki, H. und Zurek, G. (1975) "The Subunits of DNA-Dependent RNA Polymerase from E. coli: I. Amino Acid Analysis and Primary Structure of the N-Terminal Regions", FEBS Lett. 55, 242 - 350

Fujiki, H., Palm, P., Zillig, W., Calendar, R. und Sunshine, M. (1976) "Identification of a Mutation within the Structural Gene for the α Subunit of DNA-Dependent RNA Polymerase of E. coli", Molec. gen. Genet. 145, 19 - 22

Fukuda, R., Ishihama, A., Saitoh, T. und Taketo, M. (1977) "Comparative Studies of RNA Polymerase Subunits from Various Bacteria", Molec. gen. Genet. 154, 135 - 144

Geisser, M., Tischendorf, G.W., Stöffler, G. und Wittmann, H.G. (1973a) "Immunological and Electrophoretical Comparison of Ribosomal Proteins from Eight Species Belonging to Enterobacteriaceae", Molec. gen. Genet. 127, 111 - 128

Geisser, M., Tischendorf, G.W. und Stöffler, G. (1973b) "Comparative Immunological and Electrophoretic Studies on Ribosomal Proteins of Bacillaceae", Molec. gen. Genet. 127, 129 - 145

Gerstein, J.F., Levine, L. und Van Vunakis, H. (1964) "Altered Antigenicity of Pepsinogen and Pepsin as an Index of Conformational Change: Effect of Urea and Reducing Agents", Immunochem. 1, 3 - 14

Gross, E. und Witkop, B. (1962) "Nonenzymatic Cleavage of Peptide Bonds: The Methionine Residues in Bovine Pancreatic Ribonuclease", J. Biol. Chem. 237, 1856 - 1860

Haas, H. und Zwilling, R. (1976) "Quantitativer Strukturvergleich von Proteinoberflächen durch Mikro-Complementfixierung", Naturwissenschaften 63, 139 - 143

Hartmann, G.R. (1976) "Austausch von Untereinheiten zwischen Enzymen aus verschiedenen Organismen in vitro: Enzymchimären", Angew. Chem. 88, 197 - 203

Heil, A. und Zillig, W. (1970) "Reconstitution of Bacterial DNA-Dependent RNA Polymerase from Isolated Subunits as a Tool for the Elucidation of the Role of the Subunits in Transcription", FEBS Lett. 11, 165 - 168

Higo, K., Held, W., Kahan, L. und Nomura, M. (1973) "Functional Correspondence between 30 S Ribosomal Proteins of Escherichia coli and Bacillus stearothermophilus", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 944 - 948

Huber, R., Epp, O. und Formanek, H. (1969) "The Environment of the Haem Group in Erythrocruorin (Chironomus thummi)", J. Mol. Biol. 42, 591 - 594

Jaenicke, L. (1966) "Einführung in die Praxis des Biochemikers", Institut für Biochemie der Universität Köln, als Manuskript gedruckt, S. 40 - 41

James, M.N.G., Delbaere, L.T.J. und Brayer, G.D. (1978) "Amino Acid Sequence Alignement of Bacterial and Mammalian Pancreatic Serine Proteases Based on Topological Equivalences", Can. J. Biochem. 56, 396 - 402

Kabat, E.A. (1961) "Kabat and Mayer's Experimental Immunochemistry", 2nd ed., Charles C Thomas, Springfield, Ill. pp. 78 - 90

Katz, A.M., Dreyer, W.J. und Anfinsen, C.B. (1959) "Peptide Separation by Two-dimensional Chromatography and Electrophoresis", J. Biol. Chem. 234, 2897 - 2900

Kessler, C. (1976) "Die rifampicininduzierte Synthese von Dinucleosidtetraphosphat", Diplomarbeit, Universität München

Konze-Thomas, B. und Rüger, W. (1976) "Functional Hybrid Enzymes Reconstituted from Escherichia coli and Serratia marcescens RNA Polymerase Subunits" Eur. J. Biochem. 63, 321 - 329

Krauss, S.W. und Milman, G. (1977) "Characterisation of Cyanogen Bromide Peptides of Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase by a Micromethod", Anal. Biochem. 82, 38 - 45

Laemmli, K.U. (1970) "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", Nature 227, 680 - 685

Lazdunski, C.J. (1976) "Antibodies as Probes for the Detection of Conformational Changes in Proteins", Trends. Biochem. Sci. 1, 231 - 232

Levine, L. und Van Vunakis, H. (1967) "Micro Complement Fixation" in "Methods in Enzymology" (Hirs, C.H.W., ed.) Vol. XI, Academic Press, New York and London, pp. 928 - 936

Li, S.L. und Yanofsky, C. (1972) "Amino Acid Sequences of Fifty Residues from the Amino Termini of the Tryptophan Synthetase α Chains of Several Enterobacteria", J. Biol. Chem. 247, 1031 - 1037

Lill, H.R. (1973)"Wirkung von Proteasen auf Funktion, Aufbau und Gestalt der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus Escherichia coli", Dissertation, Universität Würzburg

Lill, H.R. und Hartmann, G.R. (1975) "Digestion with Matrix-Bound Proteases as a Possible Probe for the Topography of the DNA-Dependent RNA Polymerase from Escherichia coli", Eur. J. Biochem. 54, 45 - 53

Lill, U.I., Behrendt, E.M. und Hartmann, G.R. (1975) "Hybridization in vitro of Subunits of the DNA-Dependent RNA Polymerase from Escherichia coli and Micrococcus luteus", Eur. J. Biochem. 52, 411 - 420

Lill, U.I., Kniep-Behrendt, E.M., Bock, L. und Hartmann, G.R. (1977) "Purification and Characterization of the DNA-Dependent RNA Polymerase and its Subunit σ from Micrococcus luteus", Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1591 - 1603

Linn, T.G., Greenleaf, A.L., Shorenstein, R.G. und Losick, R. (1973) "Loss of the Sigma Activity of RNA Polymerase of Bacillus subtilis during Sporulation", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1865 - 1869

Lipkin, V.M., Modyanov, N.N., Kocherginskaya, S.A., Chertov, O.Yu., Nikiforov, V.G. und Lebedev, A.N. (1976) "Comparison of Peptide Maps of α-Subunits of the RNA Polymerases from Microorganisms of Enterobactereaceae Family", Bioorg. Khim. 2, 1174 - 1181

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951) "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", J. Biol. Chem. 193, 265 - 275

Margoliash, E., Nisonoff, A. und Reichlin, M. (1970) "Immunological Activity of Cytochrome C. I. Precipitating Antibodies to Monomeric Vertebrate Cytochromes C", J. Biol. Chem. 245, 931 - 939

Maron, E., Shizawa, C., Arnon, R. und Sela, M. (1971) "Chemical and Immunological Characterization of a Unique Antigenic Region in Lysozyme", Biochemistry 10, 763 - 771

Mendez, E. und Lai, C.Y. (1975) "Reaction of Peptides with Fluorescamine on Paper after Chromatography or Electrophoresis", Anal. Biochem. 65, 281 - 292

Messer, W. und Melchers, F. (1969) "The Activation of Mutant β-Galactosidase by Specific Antibodies" in "The Lactose Operon" (Backwith, J.R., and Zipser, D., eds.), Cold Spring Harbor, New York, pp. 305 - 315

Modrich, P. und Zabel, D. (1976) "EcoRI Endonuclease. Physical and Catalytic Properties of the Homogeneous Enzyme", J. Biol. Chem. 251, 5866 - 5874

Murphy, T.M. und Mills, S.E. (1969) "Different Specifities in Antisera Prepared against Escherichia coli Tryptophan Synthethase α Subunit", J. Immunol. 103, 1377 - 1384

Nisonoff, A., Reichlin, M. und Margoliash, E. (1970) "Immunological Activity of Cytochrome C. II. Localisation of a Major Antigenic Determinant of Human Cytochrome C", J. Biol. Chem. 245, 940 - 946

Nüsslein, C. und Heyden, B. (1972) "Chromatography of RNA-Polymerase from E. coli on Single Stranded DNA-Agarose Columns", Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 282 - 289

Olden, K. und Yamada, K.M. (1977) "Direct Detection of Antigens in Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels", Anal. Biochem. 78, 483 - 490

Ouchterlony, Ö (1962) "Diffusion-In-Gel Methods for Immunological Analysis II" in "Progress in Allergy" Vol. VI, Karger, Basel, pp. 30 - 154

Ovchinnikov, Yu.A., Lipkin, V.M., Modyanov, N.N., Chertov, O.Yu. und Smirnov, Yu.V. (1977) "Primary Structure of α-Subunit of DNA-Dependent RNA Polymerase from Escherichia coli", FEBS Lett. 76, 108 - 111

Perham, R.N. (1967) "A Diagonal Paper-Electrophoretic Technique for Studying Amino Acid Sequences around the Cysteine and Cystine Residues of Proteins", Biochem. J. 105, 1203 - 1207

Phillips, A.W., Boyd, J.W., Ferguson, D.A., Jr. und Marucci, A.A. (1971) "Immunochemical Comparison of L-Asparaginases from Serratia marcescens and Escherichia coli", J. Bacteriol. 107, 461 - 467

Phillips, N.I., Jeness, R. und Kalan, E. (1968) "Immunochemical Comparison of β-Lactoglobulins", J. Immunol. 100, 307 - 313

Ploegman, J.H., Drent, G., Kalk, K.H. und Hol, W.G.J.; Heinrikson, R.L., Keim, P., Weng, L. und Russell, J. (1978a) "The Covalent and Tertiary Structure of Bovine Liver Rhodanese", Nature 273, 124 - 129

Ploegman, J.H., Drent, G., Kalk, K.H. und Hol, W.G.J. (1978b) "Structure of Bovine Liver Rhodanese", J. Mol. Biol. 123, 557 - 594

Prager, E.M. und Wilson, A.C. (1971a) "The Dependence of Immunological Cross-Reactivity upon Sequence Resemblance among Lysozymes. I. Micro-Complement Fixation Studies", J. Biol. Chem. 246, 5978 - 5989

Prager, E.M. und Wilson, A.C. (1971b) "The Dependence of Immunological Cross-Reactivity upon Sequence Resemblance among Lysozymes. II. Comparison of Precipitin and Micro-Complement Fixation Results", J. Biol. Chem. 246, 7010 - 7017

Reichlin, M. (1970) "The Distribution of Specifity in Rabbit Antisera Directed toward Human Hemoglobins", Immunochem. 7, 15 - 27

Reichlin, M. (1972) "Localizing Antigenic Determinants in Human Hemoglobin with Mutants: Molecular Correlations of Immunological Tolerance", J. Mol. Biol. 64, 485 - 496

Reichlin, M. (1974) "Quantitative Immunological Studies on Single Amino Acid Substitution in Human Hemoglobin: Demonstration of Specific Antibodies to Multiple Sites", Immunochem. 11, 21 - 27

Reichlin, M. (1975) "Amino Acid Substitution and the Antigenicity of Globular Proteins", Advan. Immunol. 20, 71 - 123

Richardson, C.C., Schildkraut, G.L., Aposhian, H.V. und Kornberg, A. (1964) "Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. XVI. Further Purification and Properties of Deoxyribonucleic Acid Polymerase of Escherichia coli", J. Biol. Chem. 239, 222 - 232

Richardson, J.S., Richardson, D.C. und Thomas, K.A. (1976) "Similarity of Three-dimensional Structure Between the Immunoglobulin Domain and the Copper, Zinc Superoxide Dismutase Subunit", J. Mol. Biol. 102, 221 - 235

Ringelmann, R., Opferkuch, W., Röllinghoff, M. und Loos, M. (1969) "Komplementmessung mit Hilfe des Mikrolitersystems", Z. med. Mikrobiol. Immunol. 154, 329 - 343

Robin, Y., Benyamin, Y. und Thoai, N.v. (1976) "Existence of Homologous Antigenic Structures in Unfolded Creatine Kinase and Arginine Kinase", FEBS Lett. 63, 174 - 178

Roeder, R.G. (1976) "Eucaryotic Nuclear RNA Polymerases" in "RNA Polymerase" (Losick, R., and Chamberlin, M., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 285 - 329

Rossmann, M.G. und Argos, P. (1976) "Exploring Structural Homology of Proteins", J. Mol. Biol. 105, 75 - 95

Rossmann, M.G. und Argos, P. (1977) "The Taxonomy of Protein Structure", J. Mol. Biol. 109, 99 - 129

Rotmann, M.B. und Celada, F. (1968) "Antibody-Mediated Activation of a Defective β-D-Galactosidase Extracted from an Escherichia coli Mutant", Proc. Nat. Acad. Sci. 60, 660 - 667

Rueckert, R.R. und Duesberg, P.H. (1966) "Non-identical Peptide Chains in Mouse Encephalitis Virus", J. Mol. Biol. 17, 490 - 502

Rupprecht, M. und Schleifer, K.-H. (1977) "Comparative Immunological Study of Catalases in the Genus Micrococcus", Arch. Microbiol. 114, 61 - 66

Rupprecht, M. (1978) "Vergleichende immunologische Untersuchungen an der Katalase bei Mikrokokken und Staphylokokken", Dissertation, Universität München

Sarich, V.M. und Wilson, A.C. (1966) "Quantitative Immunochemistry and the Evolution of Primate Albumins: Microcomplementfixation", Science 154, 1563 - 1566

Schachner, M. und Zillig, W. (1971) "Fingerprint Maps of Tryptic Peptides from Subunits of Escherichia coli and T4 Modified DNA-Dependent RNA-Polymerase", Eur. J. Biochem. 22, 513 - 519

Schaller, H., Nüsslein, C., Bonhoeffer, F.J., Kurz, C. und Nietzschmann, I. (1972) "Affinity Chromatography of DNA-Binding Enzymes on Single-Stranded DNA-Agarose Columns", Eur. J. Biochem. 26, 474 - 481

Schulz, G.E. (1977) "Regeln für Strukturen globulärer Proteine", Angew. Chem. 89, 24 - 33

Sela, M., Schechter, B., Schechter, I. und Borek, F. (1967) "Antibodies to Sequential and Conformational Determinants", Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32, 537 - 545

Sentenac, A., Simon, E.J. und Fromageot (1968) "Initiation of Chains by RNA Polymerase and the Effects of Inhibitors Studied by a direct Filtration Technique", Biochim. Biophys. Acta 161, 299 - 308

Seydel, F. (1978) "Isolierung und Charakterisierung eines Rifamycin-bindenden Proteins aus dem Periplasma von Escherichia coli", Dissertation, Universität München

Shapira, E. und Arnon, R. (1969) "Cleavage of one Specific Disulfide Bond in Papain", J. Biol. Chem. 244, 1026 - 1032

Shapiro, A.L., Viñuela, E. und Maizel, I.V. (1967) "Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels", Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815 - 820

Steers, E.,Jr., Craven, G.R. und Anfinsen, C.B. (1965) "Evidence for Nonidentical Chains in the β-Galactosidase of Escherichia coli K 12", J. Biol. Chem. 240, 2478 - 2484

Stein, S., Böhlen, P., Imai, K., Stone, J. und Udenfriend, S. (1973) "Assay of Amino Acids, Peptides, Proteins and other Primary Amines with Fluorescamine", Fluorescence News 7, 9 - 10

Stephens, R.E. (1978) "Fluorescent Thin-Layer Peptide Mapping for Protein Identification and Comparison in the Subnanomole Range", Anal. Biochem. 84, 116 - 126

Stumph, W.E., Elgin, S.C.R. und Hood, L. (1974) "Antibodies to Proteins Dissolved in Sodium Dodecyl Sulfate", J. Immunol. 113, 1752 - 1756

Swank, R.T. und Munkres, K.D. (1971) "Molecular Weight Analysis of Oligopeptides by Electrophoresis in Polyacrylamide Gel with Sodium Dodecyl Sulfate", Anal. Biochem. 39, 462 - 477

Tafler, S.W., Setlow, P. und Levine, L. (1973) "Serological Relatedness of Bacterial DNA Polymerases", J. Bacteriol. 113, 18 - 23

Teale, J.M. und Benjamin, D.C. (1977) "Antibody as an immunological Probe for Studying the Refolding of Bovine Serum Albumin. Refolding within each Domain", J. Biol. Chem. 252, 4521 - 4526

Wasserman, E. und Levine, L. (1961) "Quantitative Micro-Complement Fixation and its Use in the Study of Antigenic Structure by Specific Antigen Antibody Inhibition", J. Immunol. 87, 290 - 295

Waxdal, M.J., Konigsberg, W.H., Henley, W.L. und Edelman, G.M. (1968) "The Covalent Structure of a Human γG-Immunglobulin. II. Isolation and Characterization of the Cyanogen Bromide Fragments", Biochemistry 7, 1959 - 1966

Weiner, A.M., Platt, T. und Weber, K. (1972) "Amino-terminal Sequenz Analysis of Proteins Purified on a Nanomole Scale by Gel Electrophoresis", J. Biol. Chem. 247, 3242 - 3251

Welling, G.W., Groen, G., Beintema, J.J., Emmens, M. und Schröder, F.P. (1976) "Immunologic Comparison of Pancreatic Ribonucleases", Immunochem. 13, 653 - 658

Wilson, A.C., Kaplan, N.O., Levine, L., Pesce, A., Reichlin, M. und Allison, W.S. (1964) "Evolution of Lactic Dehydrogenases", Fed. Proc. 23, 1258 - 1266

Wilson, A.C. und Prager, E.M. (1974) "Antigenic Comparison of Animal Lysozymes" in "Lysozyme" (Osserman, E.F., Canfield, R.E., and Beychok, S., eds.), Academic Press, New York and London, pp. 127 - 142

Zillig, W., Stetter, K.O. und Tobien, M. (1978) "DNA-Dependent RNA Polymerase from Halobacterium halobium", Eur. J. Biochem. 91, 193 - 199

Zusammenfassung

1. Der Vergleich der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus E. coli und M. luteus mit Hilfe peptidchemischer Methoden ergab kaum Hinweise auf Homologien in der Primärstruktur. Der tryptische Fingerprint der α-Untereinheiten läßt auf eine Sequenzidentität von höchstens 20 - 30 % schließen. Die Untereinheiten α, β und β' der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase zeigen nach Spaltung durch Bromcyan im Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel unterschiedliche Bandenmuster. Es treten keine Fragmente mit identischem Molekulargewicht auf. Jedoch wird eine gewisse Ähnlichkeit zwischen $^{e}\alpha$ und $^{m}\alpha$ hinsichtlich der Verteilung der Methioninreste entlang der Polypeptidkette beobachtet.

2. In der Immundiffusion findet man keine Kreuzreaktion des M. luteus Core- und Holoenzyms mit Anti-^{e}holo-Serum und nur eine schwache Kreuzreaktion des E. coli Core- und Holoenzyms mit Anti-^{m}holo-Serum. Dieser Befund wird durch Mikrokomplementfixierungsversuche bestätigt: Die Immunologische Distanz zwischen den Holoenzymen beträgt um 310, gemessen mit Anti-^{e}holo-Serum und 194, gemessen mit Anti-^{m}holo-Serum.

3. Bei den rifampicinresistenten RNA-Polymerasen aus E. coli und M. luteus konnte durch Mikrokomplementfixierung gezeigt werden, daß die Mutation in der β-Untereinheit zu einer Konformationsänderung führt, die sich in einer Erhöhung der Dissoziationskonstante des Antigen-Antikörper-Komplexes äußert. Die immunchemische Untersuchung weiterer bakterieller RNA-Polymerasen mit Anti-^{e}holo- und Anti-^{m}holo-Serum durch Immundiffusion und Mikrokomplementfixierung weist auf eine Veränderung der RNA-

Polymerase in der Evolution hin, die kaum weniger ausgeprägt ist als bei einfacher gebauten Proteinen. Die eukaryotische RNA-Polymerase II aus Weizenkeimen kann weder mit Anti-^{e}holo- noch mit Anti-^{m}holo-Serum kreuzreagieren.

4. Andererseits konnte am Beispiel der RNA-Polymerase auch gezeigt werden, daß Strukturbereiche, die für die Funktion eines Enzyms wesentlich sind, im Verlauf der Evolution besonders gut konserviert werden. Die enzymatische Aktivität der RNA-Polymerase aus M. luteus kann mit Antiserum gegen E. coli RNA-Polymerase zu 30 % gehemmt werden, obwohl in der Immundiffusion keine Kreuzreaktion beobachtet wird. Alle Untereinheiten der RNA-Polymerase aus E. coli und M. luteus zeigen in der Mikrokomplementfixierungsreaktion eine bessere Kreuzreaktion als die nicht dissoziierten Enzyme. Dies spricht für eine Konservierung der Kontaktstellen zwischen den Untereinheiten und steht in Einklang mit der Bildung enzymatisch aktiver Enzymhybride zwischen der E. coli und M. luteus RNA-Polymerase durch Austausch der Untereinheiten.

Abkürzungsverzeichnis

$^{e}\alpha$	Untereinheit α der RNA-Polymerase aus *Escherichia coli*
$^{m}\alpha$	Untereinheit α der RNA-Polymerase aus *Micrococcus luteus*
Anti-^{e}core-Serum	Antiserum gegen das Coreenzym der RNA-Polymerase aus *Escherichia coli*
Anti-^{e}holo-Serum	Antiserum gegen das Holoenzym der RNA-Polymerase aus *Escherichia coli*
Anti-^{m}holo-Serum	Antiserum gegen das Holoenzym der RNA-Polymerase aus *Micrococcus luteus*
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosin-5′-triphosphat
$^{e}\beta$	Untereinheit β der RNA-Polymerase aus *Escherichia coli*
$^{m}\beta$	Untereinheit β der RNA-Polymerase aus *Micrococcus luteus*
$^{e}\beta'$	Untereinheit β′ der RNA-Polymerase aus *Escherichia coli*
$^{m}\beta'$	Untereinheit β′ der RNA-Polymerase aus *Micrococcus luteus*
Ci	Curie
CTP	Cytidin-5′-triphosphat
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
GTP	Guanosin-5′-triphosphat
h	Stunde
Ipm	Impulse pro Minute
Leu	Leucin
Lys	Lysin
min	Minute
M. luteus	*Micrococcus luteus*
RNA	Ribonucleinsäure

e_σ	Untereinheit σ der RNA-Polymerase aus Escherichia coli
m_σ	Untereinheit σ der RNA-Polymerase aus Micrococcus luteus
TEMED	N,N,N′,N′-Tetramethyläthylendiamin
TPCK	N-Tosyl-L-phenylalanyl-chlormethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5′-triphosphat
Val	Valin
VBS	veronal buffered saline

Lebenslauf

Vor- und Familienname:	Christine Ulrike Leib
Geburtstag und -ort:	11. 3. 1950, Augsburg
Eltern:	Josef Leib, Regierungsbaumeister Bonaventura Leib, geb. Winter
1956 - 1960	Volksschule in Augsburg
1960 - 1969	Neusprachliches Gymnasium in Augsburg
Juni 1969	Reifeprüfung
1969 - 1975	Studium der Chemie an der Technischen Universität München
März 1972	Diplom-Vorprüfung
Juni 1974	Diplom-Hauptprüfung
Juli 1974 - Jan. 1975	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. H. Simon am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München
März 1975 - Jan. 1979	Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. G. Hartmann am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München